

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

*Katedra analytické chemie*

---

VYUŽITÍ BÓREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ FILMOVÉ  
ELEKTRODY K VOLTAMETRICKÉ A AMPÉROMETRICKÉ  
DETEKCI AMINOBIFENYLŮ

THE UTILIZATION OF BORON-DOPED DIAMOND THIN  
FILM ELECTRODE FOR THE VOLTAMMETRIC AND  
AMPEROMETRIC DETERMINATION OF AMINO  
DERIVATIVES OF BIPHENYL

Diplomová práce  
studijního programu Učitelství chemie a biologie pro SŠ

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857, dále byla finančně podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekty LC 06035 a MSM0021620857) a Grantovou agenturou Univerzity Karlovy v Praze (projekt GAUK 92010).

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Karoliny Peckové, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 15. května 2010

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Karolině Peckové, Ph.D. za odborné vedení a všestrannou pomoc týkající se předkládané diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu, kterou mi po celou dobu mého studia poskytovali.

**Předmětová hesla:** Analytická chemie  
Aminoderiváty bifenyly  
Elektrochemická detekce  
UV detekce

**Klíčová slova:** 2-Aminobifenyl  
3-Aminobifenyl  
4-Aminobifenyl  
Diferenční pulsní voltametrie  
Spektrometrické stanovení  
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie  
Bórem dopovaná diamantová filmová elektroda

---

**Objective Words:** Analytical Chemistry  
Amino Derivatives of Biphenyl  
Electrochemical Detection  
UV Detection

**Key Words:** 2-Aminobiphenyl  
3-Aminobiphenyl  
4-Aminobiphenyl  
Differential Pulse Voltammetry  
Spectrometric Determination  
High Performance Liquid Chromatography  
Boron-Doped Diamond Thin Film Electrode

## Abstrakt

Cílem této práce bylo vyvinout metody pro stanovení 2-aminobifenylu (2-AB), 3-aminobifenylu (3-AB) a 4-aminobifenylu (4-AB) v modelových směsích. Konkrétně bylo testováno přímé stanovení směsi studovaných analytů spektrofotometricky a metodou diferenční pulsní voltametrie (DPV). Dalším přístupem byla separace a detekce 2-AB, 3-AB a 4-AB metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) s bórem dopovanou filmovou diamantovou elektrodou (BDDFE) v uspořádání „wall-jet“ a metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí (HPLC-UVD).

Bylo zjištěno, že spektrofotometrické stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB ve směsi není možné vzhledem k blízkým hodnotám vlnových délek lokálních absorpčních maxim všech tří studovaných analytů. Při stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB ve směsi metodou DPV v BR pufru o pH 2,0 bylo zjištěno, že rozdíl potenciálů píků 2-AB a 3-AB je příliš malý pro směsné stanovení. Při stanovení směsi obsahující 2-AB a 4-AB v BR pufru o pH 12,0 byly získány meze stanovitelnosti ( $L_D$ ) v koncentračním řádu  $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> pro 2-AB a  $10^{-7}$  mol.l<sup>-1</sup> pro 4-AB.  $L_D$  pro směs obsahující 3-AB a 4-AB byly získány v koncentračním řádu  $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> pro 3-AB a  $10^{-7}$  mol.l<sup>-1</sup> pro 4-AB. Při stanovení metodami HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“ a HPLC-UVD byla pro separaci analytů byla použita kolona LiChroCART ChiraDex® (250 × 4 mm, 5 μm, Merck, Německo) s kovalentně vázaným β-cyklodextrinem a mobilní fáze připravená smísením octanového pufru o pH 5,0 a koncentraci 0,01 mol.l<sup>-1</sup>, methanolu a acetonitrilu v poměru 40:30:30 (v/v/v), průtoková rychlost mobilní fáze 1,0 ml.min<sup>-1</sup>, dávkovaný objem 20 μl, vlnová délka λ 290 nm, potenciál detekce +1,0 V a vzdálenost povrchu elektrody od ústí kapiláry s mobilní fází 1,5 mm. Při stanovení metodou HPLC-UVD byly získány  $L_D$  v koncentračním řádu  $10^{-7}$  mol.l<sup>-1</sup> pro 2-AB a 3-AB a  $10^{-8}$  mol.l<sup>-1</sup> pro 4-AB. Při stanovení metodou HPLC-ED byly získány meze stanovitelnosti pro všechny tři analyty v koncentračním řádu  $10^{-8}$  mol.l<sup>-1</sup>.

## Abstract

The aim to this work was to develop methods for the determination of 2-aminobiphenyl (2-AB), 3-aminobiphenyl (3-AB), and 4-aminobiphenyl (4-AB) in model mixtures. Concretely, the direct determination of the mixture of studied analytes has been tested using spectrophotometry and differential pulse voltammetry (DPV). Furthermore, separation and detection of 2-AB, 3-AB, and 4-AB have been performed using high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED) with boron-doped diamond film thin electrode (BDDFE) in „wall-jet“ configuration and using high performance liquid chromatography with UV detection (HPLC-UVD).

It was found out that the spectrophotometric determination of 2-AB, 3-AB, and 4-AB is impossible in their mixture because of nearby values of local absorption maxima wavelengths of all three analytes studied. Upon the determination of 2-AB, 3-AB, and 4-AB in their mixture using DPV in BR buffer pH 2.0, the difference in peak potentials of 2-AB and 3-AB is too low for their determination in mixture. Upon the determination of mixture containing 2-AB and 4-AB in BR buffer pH 12.0, the limits of determination ( $L_{DS}$ ) were obtained in the concentration order of  $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> for 2-AB and  $10^{-7}$  mol.l<sup>-1</sup> for 4-AB.  $L_{DS}$  for the mixture containing 3-AB and 4-AB were obtained in the concentration order of  $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> for 3-AB and  $10^{-7}$  mol.l<sup>-1</sup> for 4-AB. Upon the determination using HPLC-ED with BDDFE in „wall-jet“ configuration and using HPLC-UVD, the column LiChroCART ChiraDex<sup>®</sup> (250 × 4 mm, 5 μm, Merck, Germany) with covalently bonded β-cyclodextrin has been used. Mobile phase prepared by mixing 0.01 mol.l<sup>-1</sup> acetate buffer pH 5.0, methanol and acetonitrile in the ratio 40:30:30 (v/v/v), mobile phase flow rate 1.0 ml.min<sup>-1</sup>, sampled volume 20 μl, wavelength λ 290 nm, detection potential +1,0 V, and the distance 1.5 mm of electrode surface to the orifice of capillary with mobile phase were used. Upon the determination using HPLC-UVD, the  $L_{DS}$  were obtained in concentration range of  $10^{-7}$  mol.l<sup>-1</sup> for 2-AB and 3-AB, and of  $10^{-8}$  mol.l<sup>-1</sup> for 4-AB. Limits of determination in the concentration range of  $10^{-8}$  mol.l<sup>-1</sup> have been reached for all three analytes using HPLC-ED.

## Seznam použitých zkratk a symbolů

2-AB	2-aminobifenyl
3-AB	3-aminobifenyl
4-AB	4-aminobifenyl
$A$	absorbance
$A_{\max}$	absorbance při zvolené vlnové délce
$A_p$	plocha píku
$B$	směrnice kalibrační přímky
BDDF	bórem dopovaný diamantový film
BDDFE	bórem dopovaná diamantová filmová elektroda
$c$	molární koncentrace
CPE	uhlíková pastová elektroda
CVD	chemická depozice par
$D$	difúzní koeficient
DAD	diode array detekce
DPV	diferenční pulsní voltametrie
$E_{\text{det}}$	potenciál detekce
$E_p$	potenciál píku
$\Delta E_p$	rozdíl potenciálů píku
ED	elektrochemická detekce
<b>F</b>	Faradayova konstanta
$F_m$	průtoková rychlost
FIA	průtoková injekční analýza
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
$h_s$	výška šumu
HPLC-ED	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí
HPLC-UVD	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí
$I_{\text{lim}}$	limitní proud
$I_p$	výška píku
$I_{\text{poz}}$	proud pozadí
$I_s$	proud šumu
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny

$k$	konstanta viskozity
$l$	tloušťka kyvety
$l_k$	vzdálenost povrchu BDDFE od ústí kapiláry s mobilní fází
$L_D$	mez stanovitelnosti
LDR	lineární dynamický rozsah
$n$	počet vyměňených elektronů
SPE	extrakce tuhou fází
$V_{inj}$	objem vzorku dávkovaného na kolonu
VIS	viditelná oblast
$\lambda$	vlnová délka
$\varepsilon$	molární absorpční koeficient



## Obsah

<b>1. Úvod .....</b>	<b>10</b>
1.1 Cíl práce .....	10
1.2 Biologické účinky, vznik a výskyt aminoderivátů bifenyly .....	10
1.3 Použité metody a materiály .....	11
1.4 Analytické metody pro stanovení aminoderivátů bifenyly .....	14
<b>2. Experimentální část .....</b>	<b>15</b>
2.1 Reagencie .....	15
2.2 Aparatura .....	18
2.3 Pracovní postupy .....	21
<b>3. Výsledky a diskuse .....</b>	<b>25</b>
3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou a UV detekcí .....	25
3.2 Stanovení 2-aminobifenyly, 3-aminobifenyly a 4-aminobifenyly ve směsi metodou diferenční pulsní voltametrie .....	49
3.3 Spektrometrické stanovení 2-aminobifenyly, 3-aminobifenyly a 4-aminobifenyly .....	59
<b>4. Závěr .....</b>	<b>66</b>
<b>5. Literatura .....</b>	<b>69</b>

# 1. Úvod

## 1.1 Cíl práce

Tato práce se zabývá stanovením 2-aminobifenyly (2-AB), 3-aminobifenyly (3-AB) a 4-aminobifenyly (4-AB) moderními elektrochemickými a spektrálními metodami. Vzhledem k toxicitě těchto látek a karcinogenitě 4-AB je jejich přítomnost v jakýchkoli matricích krajně nežádoucí, a proto je snahou současné analytické chemie vyvinout co nejcitlivější postupy, které by detekovaly jejich přítomnost.

Cílem této práce bylo vyvinout metody pro stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB v modelových směsích. Konkrétně bylo testováno přímé stanovení směsi studovaných analytů spektrometricky a metodou diferenční pulsní voltametrie (DPV). Dalším přístupem byla separace a detekce 2-AB, 3-AB a 4-AB metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) s bórem dopovanou filmovou diamantovou elektrodou (BDDFE) v uspořádání „wall-jet“ a metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí (HPLC-UVD).

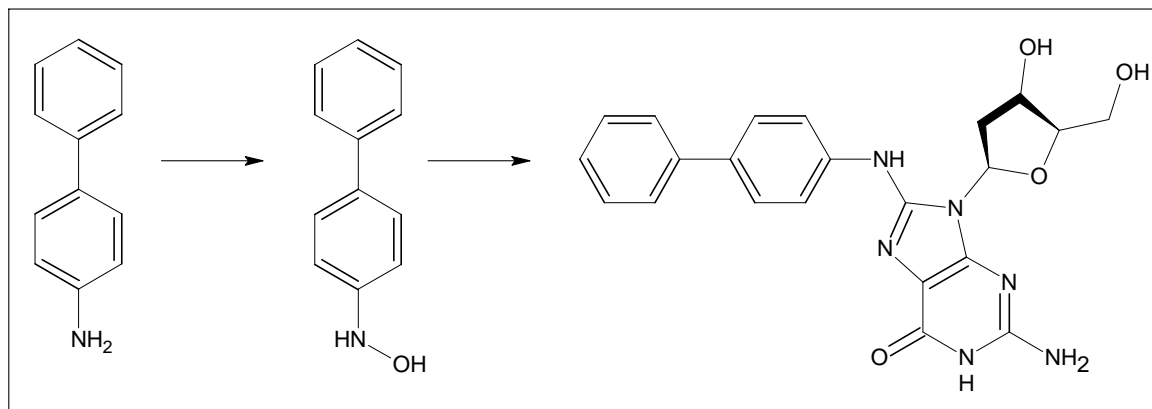
## 1.2 Biologické účinky, vznik a výskyt aminoderivátů bifenyly

Aminoderiváty bifenyly jsou toxické při vdechování, styku s kůží a při požití, hrozí nebezpečím kumulativních účinků, jsou škodlivé pro vodní organismy a mohou vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí<sup>1</sup>. Jejich zvýšenému působení jsou vystaveni kuřáci a lidé s permanentním obarvením vlasů<sup>2</sup>. Současně představují metabolity dalších genotoxických polutantů - nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků (NPAH)<sup>3</sup> - a tudíž mohou sloužit jako biomarkery míry expozice těmto nebezpečným látkám, např. v pracovním prostředí<sup>4</sup>.

U 2-AB a 3-AB nebyla prokázána mutagenita<sup>5</sup> a Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) se jimi nezabývala. 4-AB byl používán jako antioxidant v gumárenství a barvířství. V roce 1972 byl agenturou IARC na základě průkazných epidemiologických studií a testů na zvířatech zařazen mezi prokázané karcinogeny (skupina 1, látky prokazatelně karcinogenní pro člověka). Způsobuje rakovinu močového měchýře, pravděpodobně i ledvin a močových cest obecně. Od 50. let 20. století se nadále průmyslově nevyrábí, do životního

prostředí se dostává především v cigaretovém kouři<sup>6</sup>, uvolňuje se spalováním fosilních paliv<sup>7</sup> a může vznikat deaminací benzidinu z azobarviv účinkem střevní mikroflóry<sup>8</sup>.

V organismu probíhají složité biotransformační procesy vedoucí jednak k detoxifikaci a vyloučení aminobifenylů z organismu, ale i k metabolické aktivaci, při které je oxidována aminoskupina za vzniku *N*-hydroxyarylamínů, případně jejich acetylovaných forem<sup>9</sup>. Tyto reakce probíhají enzymaticky za účasti jaterního cytochromu P-450 (*N*-hydroxylace) a acetyltransferasy<sup>10</sup>. Metabolizované formy vedou k vytvoření nestabilního nitreniového iontu, ochotného reagovat s nukleofilními centry molekul DNA za tvorby aduktů<sup>11</sup>. 80 % z těchto *in vivo* vznikajících aduktů činí *N*-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-4-ABP<sup>12</sup>. Schéma celého procesu je uvedeno na Obr. 1.



**Obr. 1** Vznik aduktu 4-AB-DNA (prostřednictvím guanosinového zbytku molekuly DNA).

### 1.3 Použité metody a materiály

#### 1.3.1 Bórem dopovaná diamantová filmová elektroda

V roce 1983 byla publikována první práce zabývající se využitím polovodivých diamantových elektrod v elektrochemii<sup>13</sup>. Největší oblibu v posledních dvou desetiletích si v elektroanalytické chemii získaly bórem dopované diamantové filmy (BDDF). Připravují se metodou chemické depozice par (CVD) při použití žhavených vláken nebo mikrovlnného ohřevu jako zdroje energie. Do reaktoru je přiváděna směs methanu - zdroj uhlíku pro růst diamantu, vodíku - zajišťuje redukční prostředí a diboranu - zdroj bóru pro dopování diamantu. Jako nosiče se uplatňují křemíkové destičky s nízkým odporem, které jsou předem obroušeny diamantovým prachem. Ulpěné částičky diamantového prachu slouží jako krystalizační centra. Úpravou jednotlivých parametrů, mezi něž patří teplota, tlak, rychlost

průtoku plynů či doba růstu diamantu, lze připravit BDDFE v různých formách - od mikrokrytalické přes nanokrytalickou po ultrananokrytalickou - lišících se velikostí zrn a tloušťkou vrstvy<sup>14</sup>. K výhodným vlastnostem těchto filmů patří mechanická a chemická stabilita, malá náchylnost k pasivaci, široké potenciálové okno, nízký zbytkový proud a biokompatibilita<sup>15</sup>.

### **1.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí a ultrafialovou detekcí**

HPLC je pokročilou a instrumentálně náročnou technikou kapalinové chromatografie. V HPLC je dosahováno vysoké účinnosti separačního procesu použitím kolon naplněných stacionární fází o malé a dobře definované velikosti částic. Separační kolony pro HPLC se vyznačují vysokou hustotou a homogenitou náplně stacionární fáze, a tedy i velkým hydrodynamickým odporem. Pro dosažení dostatečného průtoku mobilní fáze (řádově  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ) je nutno aplikovat přetlak jednotek až desítek MPa. K detekci látek se nejčastěji využívá spektrometrický UV/VIS detektor, dále pak fluorimetrický, hmotnostní a vodivostní detektor. Pro detekci látek, které je možno elektrochemicky redukovat či oxidovat, se využívají detektory elektrochemické, nejčastěji ampérometrické, často v kombinaci se spektrometrickým UV/VIS detektorem.

Elektrochemická detekce (ED) získala od svého zavedení v průtokových metodách v sedmdesátých letech minulého století nezastupitelné místo mezi ostatními detekčními metodami<sup>16</sup>, podpořené v posledních deseti letech zájmem o miniaturizované detekční systémy<sup>17</sup>. Největší uplatnění nacházejí materiály obsahující různé formy uhlíku (skelný uhlík, uhlíková vlákna, porézní grafit, modifikované uhlíkové pasty a inkousty), platiny, zlata a stříbra, které jsou zpravidla používány v komerčně dostupných přístrojích.

Vzhledem k tomu, že 2-AB, 3-AB a 4-AB se často vyskytují společně a přesto se liší svými biologickými vlastnostmi, je žádoucí je od sebe separovat. Z literatury<sup>18</sup> bylo zjištěno, že 3-AB a 4-AB nelze rozdělit na koloně C18 s reverzními fázemi ani na částečně polárních kolonách. Tento jev pravděpodobně souvisí s velice malým rozdílem v  $\text{pK}_a$  těchto dvou látek (4,25 pro 3-AB a 4,22 pro 4-AB). V práci Kateřiny Jandové<sup>19</sup>, na kterou tato diplomová práce navazuje, se k separaci 2-AB, 3-AB a 4-AB osvědčila chirální kolona LiChroCART ChiraDex<sup>®</sup> ( $250 \times 4 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ , Merck, SRN) s kovalentně vázaným  $\beta$ -cyklodextrinem.

Molekuly  $\beta$ -cyklodextrinu jsou tvořeny sedmi glukopyranosovými jednotkami vzájemně spojenými  $\alpha$ -(1,4)-glykosidickými vazbami tak, že vzniká kónický útvar (kavita). Kavita je uvnitř hydrofobní a její rozměry (vnitřní průměr 0,78 nm) zhruba odpovídají velikosti bifenylového skeletu. K retenci dochází na základě hydrofobní interakce nepolární části molekuly analytu s vnitřní částí kavity, případně interakcemi aminoskupiny s polárními hydroxyly na vstupní části kavity. Poloha aminoskupiny do značné míry určuje celkové rozměry molekuly, a tedy i velikost interakcí s  $\beta$ -cyklodextrinem.

### 1.3.3 Diferenční pulsní voltametrie

DPV patří k nejcitlivějším elektroanalytickým metodám, při kterých se na potenciál, který se lineárně mění s časem, vkládá napěťový puls o amplitudě 10 až 100 mV a době trvání řádově desítek milisekund. Registruje se rozdíl proudů změřených těsně před vložením pulsu a na jeho konci. Závislost rozdílu proudu na potenciálu má tvar píku, přičemž poloha jeho vrcholu na potenciálové ose je blízká půlvlnovému potenciálu a výška je závislá na koncentraci analytu.<sup>20</sup>

### 1.3.4 Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti

V současné době platí molekulová absorpční spektroskopie v UV a VIS oblasti pro svoji rychlost, experimentální nenáročnost, přesnost a citlivost za jednu z nejužívanějších analytických metod pro stanovení látek v roztocích. Stanovení látek touto metodou je založeno na měření absorbance elektromagnetického záření molekulami látek v UV a VIS oblasti. Výsledné absorpční spektrum látky je pásové, přičemž vztah mezi množstvím absorbovaného záření (absorbancí  $A$ ) a koncentrací analytu  $c$  je dán Lambertovým–Beerovým zákonem:

$$A = c \cdot l \cdot \varepsilon$$

z něhož plyne, že absorbance  $A$  při určité vlnové délce  $\lambda$  závisí pro danou látku na její koncentraci  $c$ , tloušťce kyvety  $l$  a molárním absorpčním koeficientu  $\varepsilon$ , který je pro danou vlnovou délku  $\lambda$  konstantní.<sup>20</sup>

## 1.4 Analytické metody pro stanovení aminoderivátů bifenyly

### 1.4.1 Elektroanalytické metody

Aminoderiváty bifenyly jsou snadno oxidovatelné látky, a proto mohou být voltametriky stanovovány na vhodné pevné či pastové elektrodě. V práci<sup>21</sup> je popsáno stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB metodou DPV na uhlíkové pastové elektrodě CPE s detekčním limitem  $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  pro 2-AB a na leštěné uhlíkové elektrodě GCE s detekčním limitem  $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$  pro 4-AB.

V práci<sup>22</sup> byly stanovovány 1- a 2-aminonaftalen a 2-AB metodou DPV na CPE modifikovaných monomery  $\alpha$ -,  $\beta$ - nebo  $\gamma$ -cyklodextrinu a na sítotiskových uhlíkových elektrodách (screen printed electrodes) s povrchem modifikovaným filmem - cyklodextrinu nebo karboxymetylovaného  $\beta$ -cyklodextrinu. Ukázalo se, že takto upravené elektrody mohou sloužit jako jednoduchý a lehce dostupný biosensor, při jehož použití dochází ke kumulaci analytu na elektrodě a snižuje se mez stanovitelnosti až na hodnoty v řádu  $10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$ .

Ampérometrická detekce aminoderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků na GCE a dalších elektrodách patří mezi testované metody v HPLC a průtokové injekční analýze FIA<sup>23,24</sup>.

V mé bakalářské práci byly 2-AB, 3-AB a 4-AB stanovovány metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „thin-layer“ v pitné a říční vodě. S využitím extrakce tuhou fází (SPE) byly studované analyty stanoveny v koncentračním řádu  $10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$ .<sup>25, 26, 27</sup>

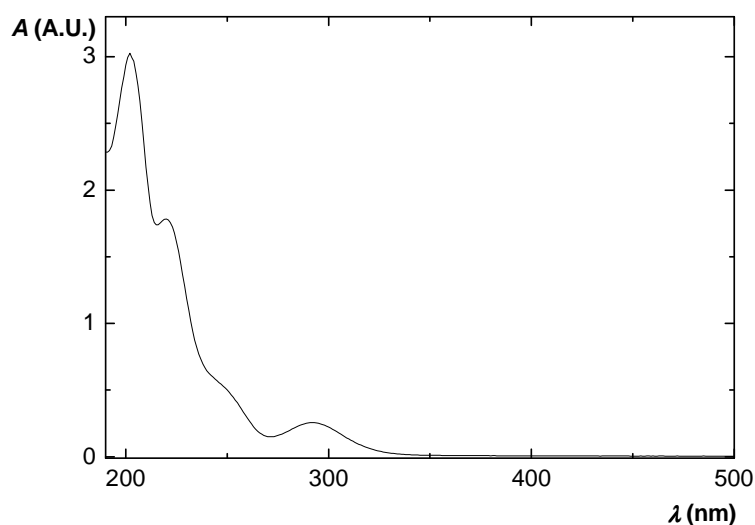
### 1.4.2 Spektrometrické metody

Aminoderiváty bifenyly lze stanovit přímo měřením absorpance v ultrafialové oblasti spektra nebo po derivatizaci převedením na barevná azobarviva. Výhodou spektrofotometrického stanovení je jednoduchost, snadná dostupnost instrumentace i poměrně nízká cena analýzy. Stanovení však mohou rušit některé sloučeniny, jako např. naftoly, hydroxylamin, 4-nitroanilin a 8-hydroxychinolin<sup>17</sup>. Běžně se používá UV/VIS a diode array (DAD) detekce u metod HPLC a FIA<sup>24, 28</sup>.

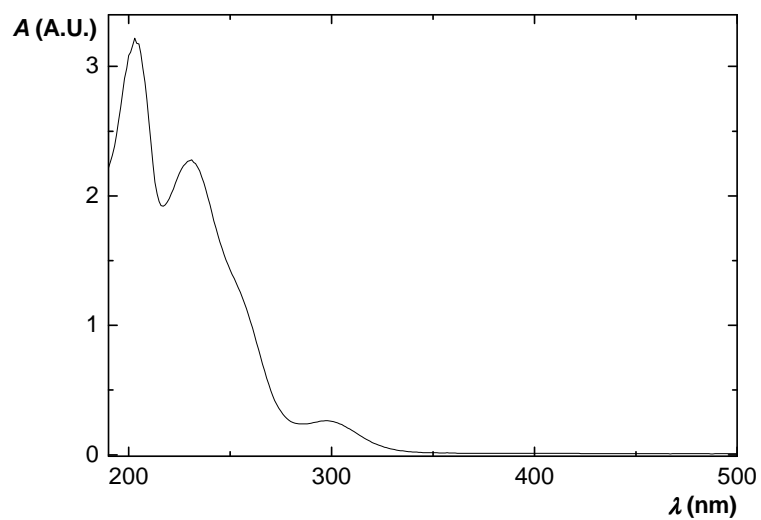
## 2. Experimentální část

### 2.1 Reagencie

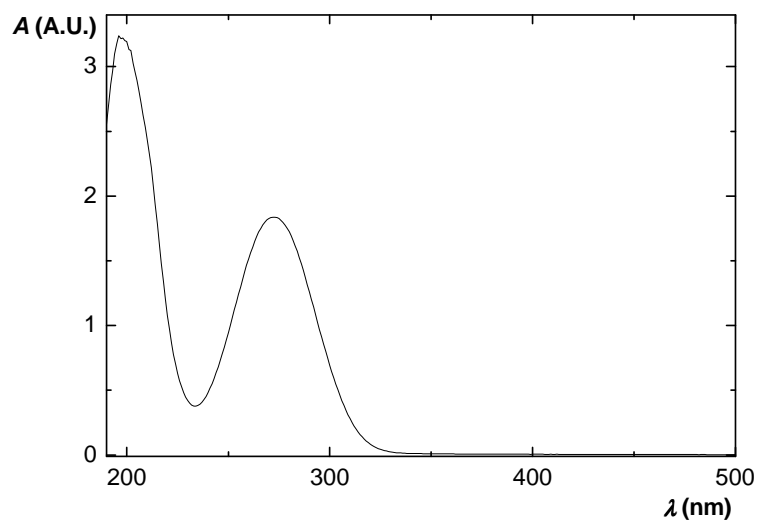
Zásobní roztoky 2-AB (Sigma - Aldrich, 97%), 3-AB (syntetizoval Dr. Jan Šarek, KOCH, PřF UK) a 4-AB (Sigma - Aldrich, 97%) o koncentraci  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  byly připraveny rozpuštěním přesně naváženého množství dané látky v 250 ml deionizované vody (Milli - Q plus system, Millipore, USA) za pomoci ultrazvuku. Roztoky o nižších molaritách byly připravovány přesným ředěním zásobních roztoků studovaných látek. Studované roztoky jsou stále nejméně 120 dní<sup>19</sup>. Absorpční spektrum 2-AB je uvedeno na Obr. 2, 3-AB na Obr. 3 a 4-AB na Obr. 4. Bližší charakteristiky studovaných látek jsou uvedeny v Tab. 1. Všechny roztoky byly uchovávány v temnu za laboratorní teploty.



**Obr. 2** Absorpční spektrum roztoku 2-AB o koncentraci  $c = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  v deionizované vodě. Měřeno metodou molekulové absorpční spektrometrie proti deionizované vodě v křemenných kyvetách o měrné tloušťce  $l = 1 \text{ cm}$ .



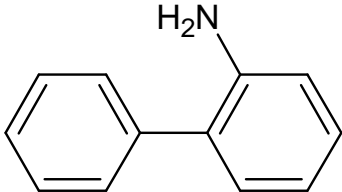
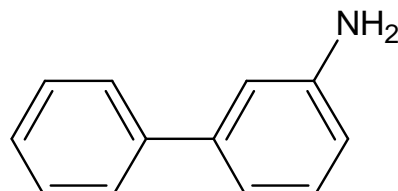
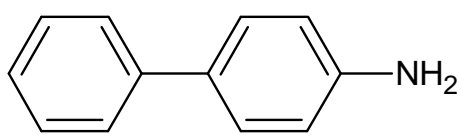
**Obr. 3** Absorpční spektrum roztoku 3-AB o koncentraci  $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  v deionizované vodě. Měřeno metodou molekulové absorpční spektrometrie proti deionizované vodě v křemenných kyvetách o měrné tloušťce  $l$  1 cm.



**Obr. 4** Absorpční spektrum roztoku 4-AB o koncentraci  $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  v deionizované vodě. Měřeno metodou molekulové absorpční spektrometrie proti deionizované vodě v křemenných kyvetách o měrné tloušťce  $l$  1 cm.



**Tab. 1** Vybrané charakteristiky 2-AB, 3-AB a 4-AB.

Strukturní vzorec	Sumární vzorec	Relativní molární hmotnost
	$C_{12}H_{11}N$	169,23
	$C_{12}H_{11}N$	169,23
	$C_{12}H_{11}N$	169,23
pKa	C.A.S. Name	C.A.S. Registry Number
3,82	2-Aminobiphenyl	90-41-5
4,25	3-Aminobiphenyl	2243-47-2
4,22	4-Aminobiphenyl	92-67-1

Pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s elektrochemickou a UV detekcí byla použita octová kyselina (Lach-Ner, Neratovice), hydroxid sodný (Lach-Ner, Neratovice), methanol a acetonitril v chromatografické čistotě dodal Merck, Praha.

Octanový tlumivý roztok o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 byl připraven smísením 0,577 ml 99% octové kyseliny s 900 ml deionizované vody. pH vzniklého roztoku bylo upraveno na hodnotu 5,0 roztokem hydroxidu sodného o koncentraci  $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ . Roztok byl doplněn deionizovanou vodou na 1 l.

Kyselá složka Brittonova–Robinsonova pufru (BR pufr) byla připravena rozpuštěním 2,7 g kyseliny trihydrogenborité ve 100 ml deionizované vody. K roztoku bylo přidáno 2,3 ml 99,8 % kyseliny octové, 2,7 ml 85 % kyseliny trihydrogenfosforečné a vzniklý roztok byl doplněn deionizovanou vodou na 1 l. Zásaditá složka Brittonova–Robinsonova tlumivého roztoku byla připravena rozpuštěním 8,0 g hydroxidu sodného ve 900 ml deionizované vody a vzniklý roztok byl doplněn deionizovanou vodou na 1 l.

Všechny chemikálie, pokud není uvedeno jinak, byly čistoty p.a.

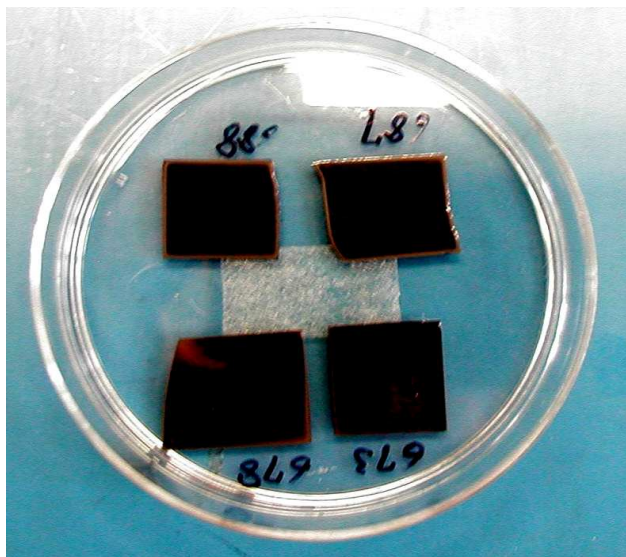
Při stanovení metodami HPLC-ED, HPLC-UVD i DPV byla přesná hodnota pH měřena digitálním pH-metrem Jenway 4330 (Jenway, Chelmsford, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005). pH-metr byl kalibrován standardními vodnými pufrů (Sevac, Praha) za laboratorní teploty.

## **2.2 Aparatura**

### **2.2.1 Bórem dopovaná filmová diamantová elektroda**

BDD film používaný při HPLC a DPV byl dodán prof. G. M. Swainem (Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA). Jednalo se o bórem dopovaný mikrokrytalický diamantový film připravený technikou CVD směsí metanu, vodíku a diboranu v komerčně dodávaném reaktoru (1,5 kW, ASTeX Inc., Lowell, MA) na p-Si (100) (měrný odpor  $\sim 10^{-3} \Omega \text{ cm}$ ) destičkách o rozměrech cca 1×1 cm (viz Obr. 5). Podmínky depozice byly následující: 1 kW (výkon mikrovlny), tlak 45 torr,  $\sim 800^\circ\text{C}$ ; 0,5 % poměr  $\text{CH}_4/\text{H}_2$ , 10 ppm  $\text{B}_2\text{H}_6$  v  $\text{H}_2$ , doba růstu filmu 10 hodin. Povrch BDD filmů byl hydrogenován. Tloušťka BDD filmu byla 5  $\mu\text{m}$ , velikost krystalků diamantu 1 - 3  $\mu\text{m}$ , měrný odpor 0,1  $\Omega \text{ cm}^{15}$ .

Křemíková destička s deponovaným BDD filmem byla použita jako elektrodový materiál pro pracovní BDDFE. Tato elektroda byla dříve zkonstruována v naší laboratoři<sup>29</sup> (viz Obr. 6A), jedná se o diskovou elektrodu s geometrickou plochou bórem dopovaného diamantového filmu 12,6 mm<sup>2</sup>.

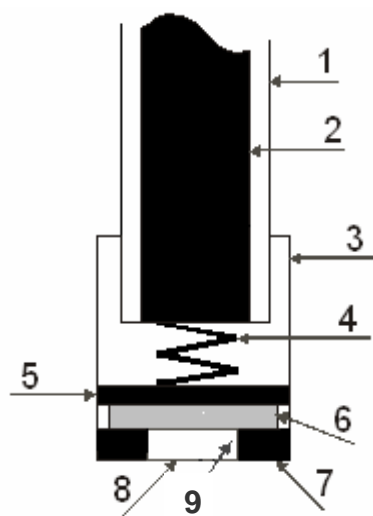


**Obr. 5** Bórem dopovaný diamantový film deponovaný na p-Si destičkách o rozměrech cca 1×1 cm.

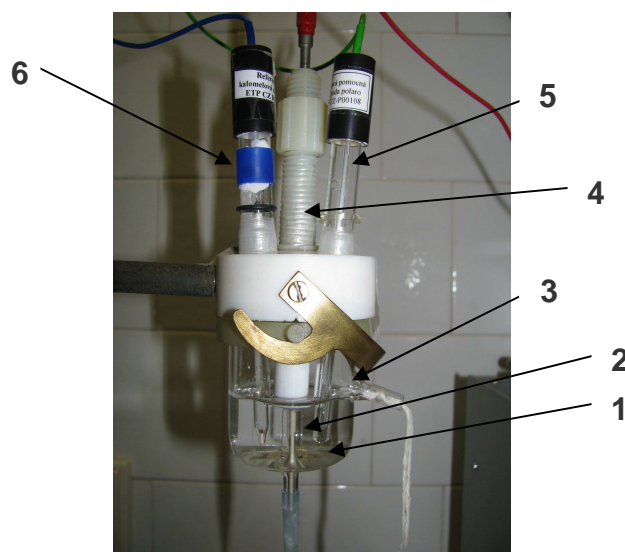
### 2.2.2 Přístrojové vybavení

Měření technikou HPLC byla prováděna na kapalinovém chromatografu ve složení: gradientová pumpa L-7100, autosampler L-7200, spektrometrický UV/VIS detektor L-7400, řídící jednotka D-7000 (vše Merck–Hitachi, Německo). Obsluhu systému, sběr a vyhodnocení dat zajišťoval osobní počítač s programem HSM (Merck–Hitachi, Německo) pracující v operačním systému MS Windows NT 4.0. Pro HPLC separaci aminobifenylů byla použita kolona LiChroCART ChiraDex<sup>®</sup> (250 × 4 mm, 5 μm, Merck, Německo) s kovalentně vázaným β-cykloextrinem a předkolona LiChroCART ChiraDex<sup>®</sup> (4 × 4 mm, 5 μm, Merck, Německo). Měření byla prováděna za laboratorní teploty, kolona nebyla termostatována. Používané mobilní fáze byly odvzdušňovány ultrazvukem PS 02000 A (Powersonic, San Diego, USA). Spektrometrický UV/VIS detektor byl stabilně nastaven na 290 nm, což bylo převzato z práce<sup>18</sup>. Za tímto detektorem byl sériově zapojen ampérometrický detektor realizovaný jako elektrochemický „wall-jet“ detektor tvořený přepadovou nádobkou naplněnou nosným roztokem, s pracovní elektrodou pevně fixovanou proti ústí výtokové trubičky z aparatury (viz Obr. 6.B). Detektor pracoval v tříelektrodovém zapojení. Jako pracovní elektroda byla použita disková BDDFE, jako referentní elektroda sloužila nasycená kalomelová elektroda a jako pomocná sloužila elektroda platinová. Pracovní potenciál, tj. potenciál vkládaný na pracovní elektrodu, byl po provedené optimalizaci nastaven na hodnotu +1,0 V. Byl použit potenciostat ADLC 2 (Laboratorní přístroje, Praha, ČR).

(A)



(B)



**Obr. 6 (A):** Schéma diskové pracovní elektrody: tělo elektrody vyrobené z teflonu (1), přívodní kontakt (2), šroubovací nástavec vyrobený z teflonu (3), kovová pružinka (4), mosazný plíšek (5), BDDF na Si substrátu (6), těsnění z Vitonu® (7) a otvor pro přístup roztoku (8), dutina o výšce  $l_k = 1,5$  mm oddělující BDDF od roztoku (9). **(B):** Elektrochemický „wall-jet“ detektor: nosný roztok (1), kapilára s mobilní fází (2), přepadová nádobka (3), pracovní BDDFE (4), pomocná Pt elektroda (5), referentní nasycená kalomelová elektroda (6).

Při voltametrických stanoveních byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 5.1 (EkoTrend Plus, Praha, ČR), pracující v operačním systému Windows 98 SE (Microsoft Corporation, USA). Jednotlivá měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení. Jako pracovní elektroda sloužila disková BDDFE, jako pomocná elektroda byla použita nasycená kalomelová elektroda a jako pomocná elektroda platinová.

Spektrometrická měření byla prováděna na přístroji Hewlett Packard 8453 Diode Array Spectrophotometer (Nizozemí) v křemenných kyvetách měrné tloušťky  $l$  1 cm.

## 2.3 Pracovní postupy

Při optimalizaci podmínek pro stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB metodami HPLC-ED v uspořádání „wall-jet“ a HPLC-UVD byly roztoky o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  dávkované do HPLC systému připraveny přesným ředěním zásobních roztoků deionizovanou vodou v den analýzy. Optimalizací složení mobilní fáze a vlnové délky  $\lambda$  pro UV detekci se zabývala práce<sup>19</sup>. Jako optimální mobilní fáze byla určena směs skládající se ze 40 objemových dílů  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  octanového pufru o pH 5,0, 30 dílů methanolu a 30 dílů acetonitrilu. Optimální hodnota vlnové délky  $\lambda$  byla zvolena 290 nm. Při optimalizaci potenciálu detekce  $E_{\text{det}}$  byl vzorek analyzován v rozmezí  $E_{\text{det}} +0,8 \text{ V}$  až  $+1,4 \text{ V}$ . Potenciál vkládaný na pracovní elektrodu byl nastavován přímo na potenciostatu. Při optimalizaci  $E_{\text{det}}$  byla vyhodnocována výška píku  $I_p$  jednotlivých látek, velikost proudu pozadí  $I_{\text{poz}}$  a velikost proudu šumu  $I_s$  pro elektrochemickou detekci. Ze získaných výsledků byly vypracovány závislosti  $I_p$  na  $E_{\text{det}}$ ,  $I_{\text{poz}}$  na  $E_{\text{det}}$ ,  $I_s$  na  $E_{\text{det}}$  a  $I_p/I_s$  na  $E_{\text{det}}$ . Z dosažených závislostí byl určen optimální potenciál detekce  $E_{\text{det}} +1,0 \text{ V}$ . Při stanovení optimální průtokové rychlosti  $F_m$  byla tato měněna v rozmezí  $F_m 0,5 - 1,5 \text{ ml.s}^{-1}$ . Hodnota  $F_m$  byla nastavována v softwaru HPLC systému. Při optimalizaci  $F_m$  byla vyhodnocována výška píku  $I_p$  a plocha píku  $A_p$  pro ED i UVD a z dosažených výsledků byly vypracovány závislosti  $I_p$  a  $A_p$  na  $F_m$  pro ED i UVD a závislost  $\log I_p$  na  $\log F_m$  pro ED. Ze získaných závislostí byla určena optimální  $F_m$  a také hodnota koeficientu  $x$ , závislého na typu indikační elektrody. Hodnota  $x$  je charakteristikou každého detektoru a byla stanovena ze směrnice závislosti  $\log I_p$  na  $F_m$ . Při optimalizaci objemu vzorku dávkovaného na kolonu  $V_{\text{inj}}$  byla jeho hodnota měněna v rozmezí  $V_{\text{inj}} 5,0 \mu\text{l} - 50,0 \mu\text{l}$ . Změna  $V_{\text{inj}}$  byla nastavována v softwaru HPLC systému. Při optimalizaci  $V_{\text{inj}}$  byla vyhodnocována  $I_p$  a  $A_p$  pro ED i UV detekci. Ze získaných výsledků byly vypracovány závislosti  $I_p$  a  $A_p$  na  $V_{\text{inj}}$ , z nichž byl určen optimální  $V_{\text{inj}} 20 \mu\text{l}$ . Při stanovení optimální vzdálenosti povrchu BDDFE od ústí kapiláry, z níž vytéká mobilní fáze  $l_k$ , byly studované látky stanovovány v rozmezí  $l_k 1,5 - 4,0 \text{ mm}$ . Byla vyhodnocována  $I_p$  a  $A_p$  pro ED a z dosažených výsledků zpracovány závislosti  $I_p$  a  $A_p$  na  $l_k$ . Z těchto závislostí byla určena optimální hodnota  $l_k 1,5 \text{ mm}$ .

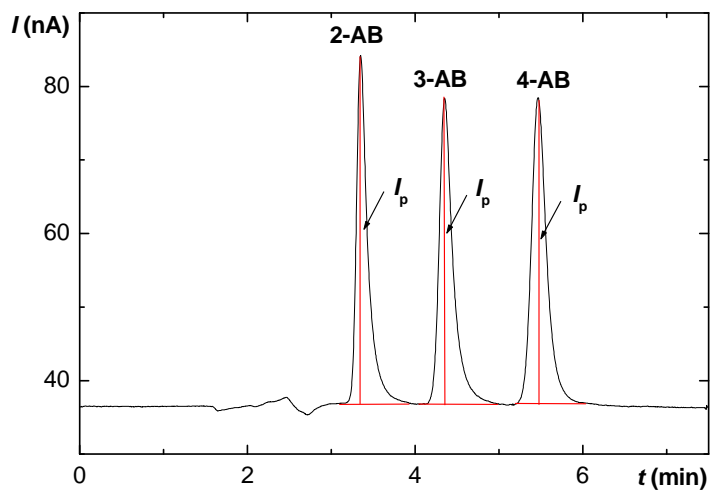
Při proměřování kalibračních závislostí 2-AB, 3-AB a 4-AB za optimalizovaných podmínek byly kalibrační roztoky připraveny přesným ředěním zásobních roztoků mobilní fází v den analýzy. Do 10 ml odměrné baňky bylo odpipetováno potřebné množství zásobních roztoků 2-AB, 3-AB a 4-AB o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  a doplněno na 10 ml mobilní fází. Poté byl proveden záznam chromatografické křivky. Při stanovení byla vyhodnocována  $I_p$  a  $A_p$  pro ED i UVD. Ze získaných výsledků byly vypracovány kalibrační závislosti, tj. závislosti

$I_p$  a  $A_p$  na  $c$  analytu, resp.  $\log I_p$  a  $\log A_p$  na  $\log c$ . Na Obr. 7 je vykázán způsob vyhodnocení výšky píku  $I_p$  při HPLC. Meze detekce  $L_D$  byly stanovovány jako  $c$  analytů odpovídající podílu trojnásobku absolutní hodnoty proudu šumu  $I_s$  a směrnice kalibrační přímky  $b$  ( $L_D = 3I_s/b$ ).

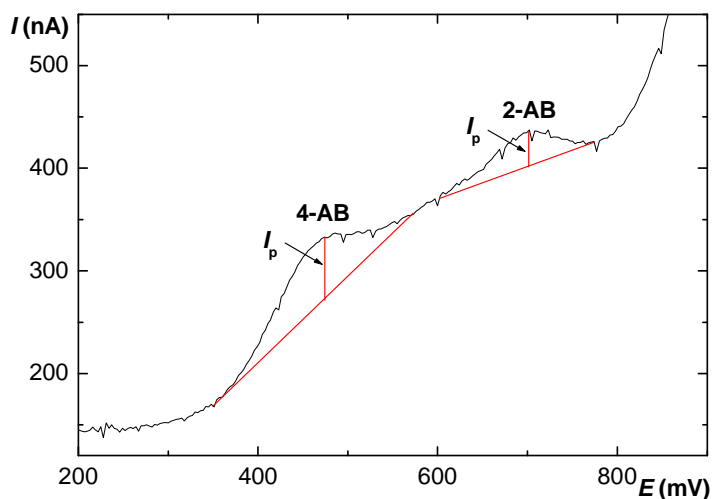
Při stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB ve směsi metodou DPV byly měřené roztoky připraveny přesným ředěním zásobních roztoků BR puřem o příslušném pH. Vždy byly studovány dvojsložkové směsi analytů, tj. do 10 ml odměrné baňky bylo odpipetováno potřebné množství zásobních roztoků 2-AB a 3-AB, resp. 2-AB a 4-AB, resp. 3-AB a 4-AB o koncentraci každé složky  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  a doplněno na 10 ml BR puřem o příslušném pH. Takto připravený roztok byl převeden do voltametrické nádoby a promíchán. Před vstupem dusíku do nádoby byla zařazena promývačka obsahující deionizovanou vodu. Poté byl proveden záznam voltametrické křivky. Při stanovení byla vyhodnocována výška píku obou analytů ve směsi. Ze získaných výsledků byly vypracovány kalibrační závislosti při zachování konstantní koncentrace jednoho analytu a měnící se koncentraci druhého analytu, tj. závislosti  $I_p$  na  $c$  analytu. Na Obr. 8 je uveden způsob vyhodnocení výšky píku  $I_p$  při DPV. Meze detekce  $L_D$  byly stanovovány jako koncentrace analytů odpovídající podílu trojnásobku absolutní hodnoty proudu šumu  $I_s$  (pro ED) či podílu trojnásobku absolutní hodnoty výšky šumu  $h_s$  (pro UVD) a směrnice kalibrační přímky  $b$  ( $L_D = 3I_s/b$ ;  $L_D = 3h_s/b$ ).

Při spektrometrickém stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB v deionizované vodě byly měřené roztoky připraveny přesným ředěním zásobních roztoků deionizovanou vodou. Do 10 ml odměrné baňky bylo odpipetováno potřebné množství zásobního roztoku 2-AB, resp. 3-AB, resp. 4-AB o  $c \cdot 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  a doplněno na 10 ml deionizovanou vodou. 1 ml vzorku byl převeden do křemenné kyvety o měrné tloušťce  $l$  1,0 cm a poté bylo změřeno jeho spektrum v rozmezí vlnových délek 190 - 500 nm. Měření bylo prováděno proti deionizované vodě. Při stanovení byla vyhodnocována výška absorpčního maxima  $A_{\max}$  pro zvolenou vlnovou délku, pro 2-AB  $\sim 292 \text{ nm}$ , pro 3-AB  $\sim 297 \text{ nm}$  a pro 4-AB  $\sim 273 \text{ nm}$ . Ze získaných výsledků byly vypracovány kalibrační závislosti, tj. závislosti  $A_{\max}$  na  $c$  analytu, resp.  $\log A$  na  $\log c$ . Na Obr. 9 je uveden způsob vyhodnocení výšky absorpčního maxima  $A_{\max}$  při spektrometrickém stanovení. Meze detekce  $L_D$  byly stanovovány jako koncentrace analytů odpovídající podílu trojnásobku absolutní hodnoty výšky šumu a směrnice kalibrační přímky  $b$  ( $L_D = 3h_s/b$ ).

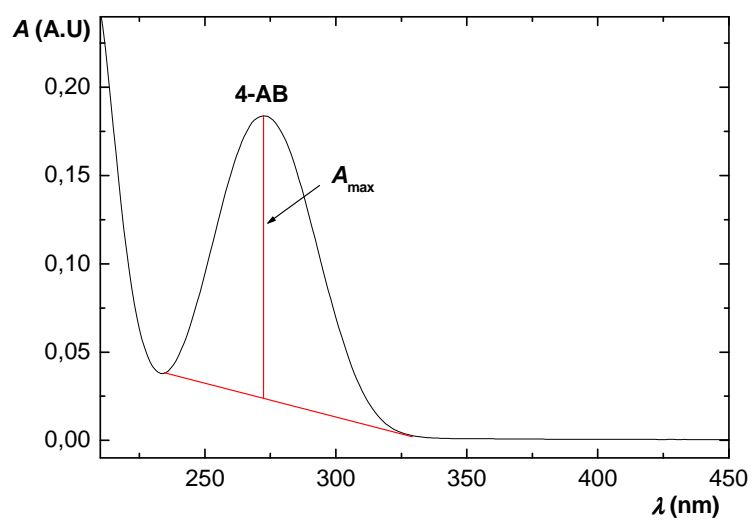
Každá analýza vzorku byla provedena nejméně třikrát. Všechna měření byla prováděna při laboratorní teplotě. Výsledky byly zpracovány v programu Microcal™ Origin®, ver 6.0.



**Obr. 7** Způsob vyhodnocení chromatogramu ( $c = 1.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  pro každý analyt). Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“,  $E_{\text{det}} = +1,0 \text{ V}$ ,  $F_m = 1,0 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $V_{\text{inj}} = 20,0 \mu\text{l}$ ,  $l_k = 1,5 \text{ mm}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).



**Obr. 8** Způsob vyhodnocení DP voltamogramu ( $c = 1.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  pro každý analyt). Měřeno metodou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 12,0.



**Obr. 9** Způsob vyhodnocení spektrometrické křivky ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  4-AB). Měřeno metodou molekulové absorpční spektrometrie proti deionizované vodě v křemenné kyvetě tloušťky  $l$  1 cm.



### 3. Výsledky a diskuse

#### 3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou a UV detekcí

Optimální podmínky pro separaci 2-AB, 3-AB a 4-AB s využitím HPLC na koloně s kovalentně navázaným  $\beta$ -cyklodextrinem byly převzaty z předchozích studií naší laboratoře<sup>19, 25</sup>. Mobilní fáze obsahovala methanol, acetonitril a octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v). Separace 2-AB, 3-AB a 4-AB je dobře zřejmá např. z Obr. 7, kdy jsou retenční faktory těchto látek 0,38 pro 2-AB, 0,78 pro 3-AB a 1,24 pro 4-AB. Dále byla převzata vlnové délka  $\lambda = 290 \text{ nm}$  pro stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB metodou HPLC-UVD<sup>18</sup>. Tato hodnota  $\lambda$  je blízká lokálním absorpčním maximům  $A$  všech tří studovaných látek. Absorpční spektrum 2-AB je na Obr. 2 ( $\lambda_{\text{max}} = 292 \text{ nm}$ ), 3-AB ( $\lambda_{\text{max}} = 297 \text{ nm}$ ) na Obr. 3 a 4-AB na Obr. 4 ( $\lambda_{\text{max}} = 273 \text{ nm}$ ).

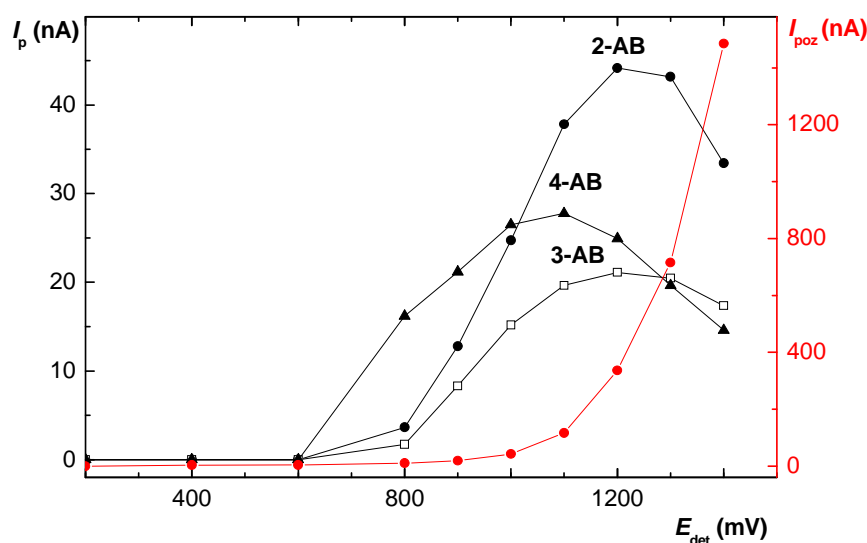
V mé bakalářské práci<sup>25</sup> jsem se zabývala optimalizací podmínek pro ampérometrickou detekci 2-AB, 3-AB a 4-AB v HPLC s využitím BDDFE v tenkovrstvém uspořádání. Tato diplomová práce je věnována HPLC stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB s využitím ampérometrické detekce na BDDFE v uspořádání "wall-jet" a s využitím UV detekce. Bylo nutné provést optimalizaci parametrů daných metod, tj. zjistit potenciál detekce  $E_{\text{det}}$  pro ampérometrickou detekci, dále průtokovou rychlost mobilní fáze  $F_m$ , objem vzorku dávkaného na kolonu  $V_{\text{inj}}$  a vzdálenost povrchu BDDFE od ústí kapiláry  $l$ , z níž vytéká mobilní fáze.

##### 3.1.1 Potenciál detekce

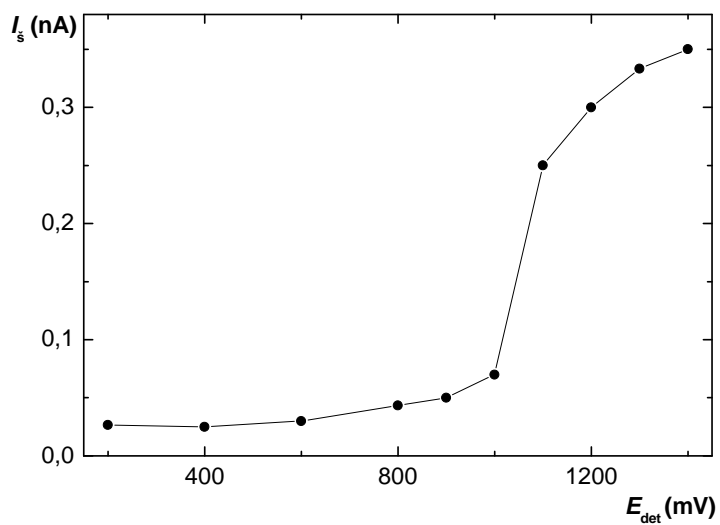
Nejprve byl zkoumán vliv potenciálu detekce  $E_{\text{det}}$  na signál elektrochemického detektoru. Roztok obsahující 2-AB, 3-AB a 4-AB o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  v deionizované vodě byl analyzován v rozmezí  $E_{\text{det}} +0,8 \text{ V}$  až  $+1,4 \text{ V}$ . Při optimalizaci byla vyhodnocována výška píku  $I_p$  jednotlivých látek, velikost proudu pozadí  $I_{\text{poz}}$  a velikost proudu šumu  $I_s$  pro elektrochemickou detekci. V rozmezí  $E_{\text{det}} +0,2 \text{ V}$  až  $+0,6 \text{ V}$  se neobjevovaly žádné viditelné píky, v rozmezí  $+0,8 \text{ V}$  až  $+1,4 \text{ V}$  byly zaznamenány píky všech tří stanovovaných látek. Velikost  $I_p$  2-AB stoupala od  $+0,8 \text{ V}$  do  $+1,2 \text{ V}$ , kde dosáhla svého maxima, od  $+1,3 \text{ V}$  do  $+1,4 \text{ V}$   $I_p$  2-AB plynule klesala. Hodnota  $I_p$  3-AB a 4-AB stoupala od  $+0,8 \text{ V}$  do  $+1,1 \text{ V}$ , kde dosáhla svého maxima, při vyšších potenciálech pro obě látky plynule klesala. Velikost

proudu pozadí  $I_{\text{poz}}$  stoupala od +0,8 V k +1,4 V, přičemž v rozmezí +1,0 V až +1,4 V byl zaznamenán jeho prudký nárůst. Závislost  $I_p$  2-AB, 3-AB a 4-AB a závislost  $I_{\text{poz}}$  na  $E_{\text{det}}$  jsou na Obr. 10. Absolutní velikost výšky šumu  $I_s$  stoupala od +0,2 V k +1,4 V a v rozmezí +1,0 V až +1,4 V byl, stejně jako u  $I_{\text{poz}}$ , zaznamenán její prudký nárůst. Závislost  $I_s$  na  $E_{\text{det}}$  je na Obr. 11. Ze získaných hodnot byly vypracovány hydrodynamické voltamogramy (Obr. 12) jako závislost podílu  $I_p/I_s$  na  $E_{\text{det}}$ . Pro 2-AB a 3-AB dosahuje tento podíl nejvyšší hodnoty u  $E_{\text{det}} = +1,0$  V, pro 4-AB dosahuje podíl nejvyšší hodnoty u  $E_{\text{det}} = +0,9$  V. Tyto hodnoty  $E_{\text{det}}$  jsou díky vzrůstajícímu šumu odlišné od hodnot potenciálů, kdy bylo dosaženo maximální výšky píků  $I_p$  pro jednotlivé analyty (viz Obr. 10, +1,2 V pro 2-AB a +1,1 V pro 3-AB a 4-AB).

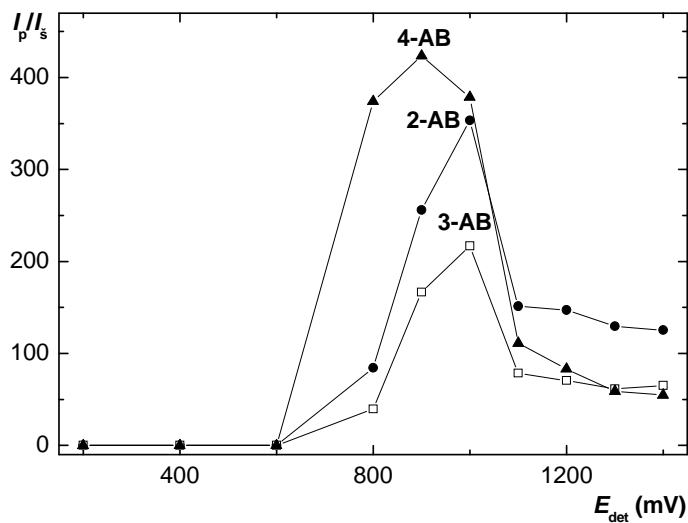
Jelikož meze detekce závisí právě na poměru výšky dané směrnici kalibrační přímky a výšku šumu, byl jako optimální potenciál detekce byl proto zvolen  $E_{\text{det}} = +1,0$  V při němž daný podíl pro 2-AB a 3-AB dosáhl nejvyšší hodnoty.



**Obr. 10** Závislost výšky píku  $I_p$  2-AB (●), 3-AB (□) a 4-AB (▲) ( $c = 1.10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> pro každý analyt) a výšky proudu pozadí  $I_{\text{poz}}$  na potenciálu pracovní elektrody  $E_{\text{det}}$ . Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“,  $F_m = 1,0$  ml.min<sup>-1</sup>,  $V_{\text{inj}} = 20,0$  μl,  $l_k = 1,5$  mm, mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci 0,01 mol.l<sup>-1</sup> a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).



**Obr. 11** Závislost proudu šumu  $I_s$  na potenciálu pracovní elektrody  $E_{\text{det}}$ . Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“,  $F_m = 1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $V_{\text{inj}} = 20,0 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $l_k = 1,5 \text{ mm}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).



**Obr. 12** Hydrodynamické voltamogramy získané jako závislost podílu proudu píku  $I_p$  2-AB (●), 3-AB (□) a 4-AB (▲) ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  pro každý analyt) a proudu šumu  $I_s$  na potenciálu detekce  $E_{\text{det}}$ . Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“,  $F_m = 1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $V_{\text{inj}} = 20,0 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $l_k = 1,5 \text{ mm}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).

### 3.1.2 Vliv průtokové rychlosti mobilní fáze

Dále byl zjišťován vliv průtokové rychlosti mobilní fáze  $F_m$  na signál elektrochemického a UV detektoru. Roztok 2-AB, 3-AB a 4-AB o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  byl analyzován při různých hodnotách průtokové rychlosti mobilní fáze  $F_m$ . Velikost  $F_m$  se měnila v rozmezí  $0,5 - 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$  a byla vyhodnocována  $I_p$  a  $A_p$  stanovovaných látek pro ED i UVD. Při ED výška píku  $I_p$  všech tří studovaných látek stoupala v celém měřeném rozsahu se vzrůstající  $F_m$ , zatímco hodnota  $A_p$  všech tří látek klesala, jak je zřejmé z Obr. 13.

Závislost limitního proudu  $I_{lim}$  na  $F_m$  pro elektrochemický detektor je určena vztahem<sup>16</sup>:

$$I_{lim} = k \cdot n \cdot F \cdot c \cdot D^{2/3} \cdot F_m^x \quad (1)$$

V tomto vztahu (1) je  $I_{lim}$  limitní proud – lze aproximovat výškou píku  $I_p$ ,  $k$  konstanta viskozity,  $n$  počet vyměněných elektronů,  $F$  Faradayova konstanta,  $c$  koncentrace analytu,  $D$  difúzní koeficient,  $F_m$  průtoková rychlost mobilní fáze a exponent  $x$  je koeficient závisející na typu indikační elektrody. Hodnotu  $x$  lze určit po zlogaritmování výše uvedené rovnice jako směrnici získané závislosti  $\log I_{lim}$  na  $\log F_m$ . Po zlogaritmování získáme výrazy:

$$\log I_{lim} = \log K + x \log F_m \quad (2)$$

$$K = k \cdot n \cdot F \cdot c \cdot D^{2/3} \quad (3)$$

Hodnota  $x$  je charakteristikou každého detektoru, hodnoty  $x$  pro různá uspořádání ampérometrických detektorů publikované v práci<sup>16</sup> jsou uvedeny v Tab. 2. Hodnotu koeficientu  $x$  lze tedy stanovit z rovnice (2) jako směrnice závislosti  $\log I_{lim}$ , resp.  $\log I_p$  na  $\log F_m$ . V Tab. 3 jsou shrnuty parametry této závislosti při ED pro 2-AB, 3-AB a 4-AB. Graficky je tato závislost vyjádřena na Obr. 14. Chromatogramy směsi studovaných látek získané pro ED při různých hodnotách  $F_m$  jsou na Obr. 15. Z Tab. 3 vyplývá, že teoretická hodnota koeficientu  $x$  pro wall-jet uspořádání ampérometrického detektoru je 0,7. Vyšší hodnoty kolem 1,6 zjištěné v této práci zřejmě souvisí s konstrukcí diskové BDD elektrody použité ve wall-jet uspořádání, kdy vlastní elektrodový materiál je umístěn v dutině o hloubce  $l_k$  1,5 mm tvořené teflonovým tělem elektrody, jak je zřejmé z Obr. 6A.

Chromatogramy analyzované směsi získané pro UVD při různých hodnotách  $F_m$  jsou na Obr. 16. Výška píku  $I_p$  i plocha píku  $A_p$  všech tří analytů klesala se vzrůstající  $F_m$ . Z Obr. 17 je patrné, že závislost  $I_p$  na  $F_m$  při UVD je pro všechny studované látky prakticky lineární, na rozdíl od závislosti  $A_p$  na  $F_m$  (viz Obr. 18).

Se vzrůstající  $F_m$  se samozřejmě zvyšovaly retenční časy  $t_r$  všech tří analytů. Retenční časy  $t_r$  2-AB, 3-AB a 4-AB při různých hodnotách  $F_m$  jsou pro ED i UVD uvedeny v Tab. 4.

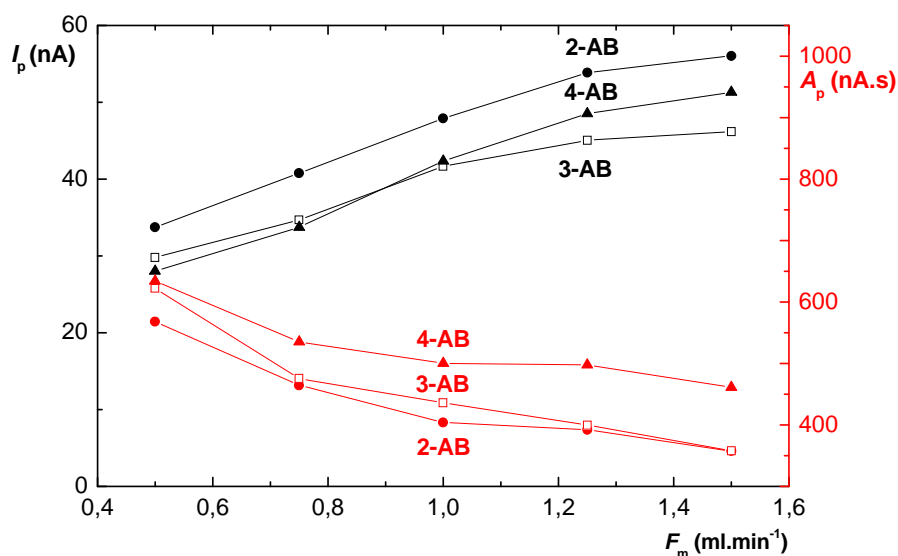
Pro další měření byla zvolena průtoková rychlost  $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , kdy docházelo k rozlišení píků jednotlivých analytů na základní linii a celková doba analýzy byla cca 7,5 min. Tato rychlost byla používána v bakalářské práci<sup>25</sup>, kde byla pro ampérometrickou detekci 2-AB, 3-AB a 4-AB v témže HPLC systému používána BDDFE v tenkovrstvém uspořádání a která bude dále použita pro srovnání výsledků.

**Tab. 2** Hodnoty koeficientů  $x$  pro různé typy ampérometrických detektorů<sup>16</sup>.

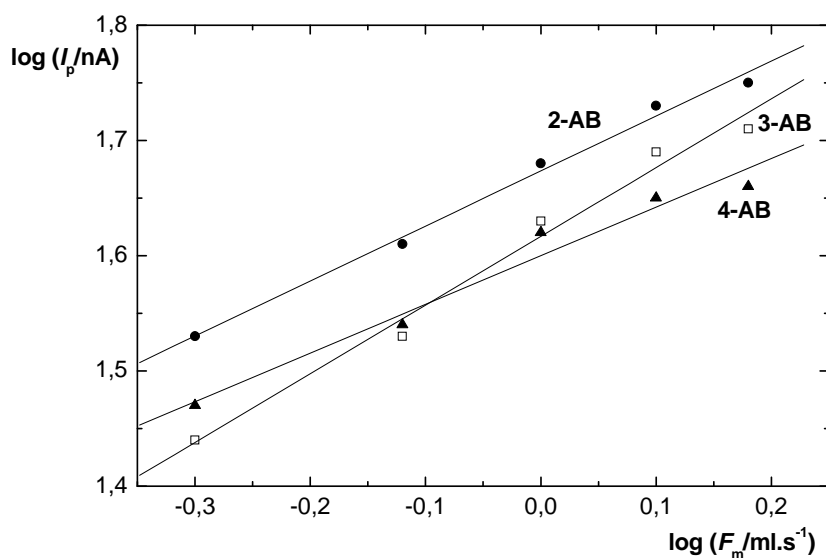
typ detektoru	„wall-jet“	cylindrický	tenkovrstvý
$x$	0,70	0,13	0,25

**Tab. 3** Parametry závislostí logaritmu výšky píku  $\log I_p$  2-AB, 3-AB a 4-AB ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  pro každý analyt) na logaritmu průtokové rychlosti  $\log F_m$  dle rovnice (2). Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“,  $E_{\text{det}} = +1,0 \text{ V}$ ,  $V_{\text{inj}} = 20,0 \mu\text{l}$ ,  $l_k = 1,5 \text{ mm}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).

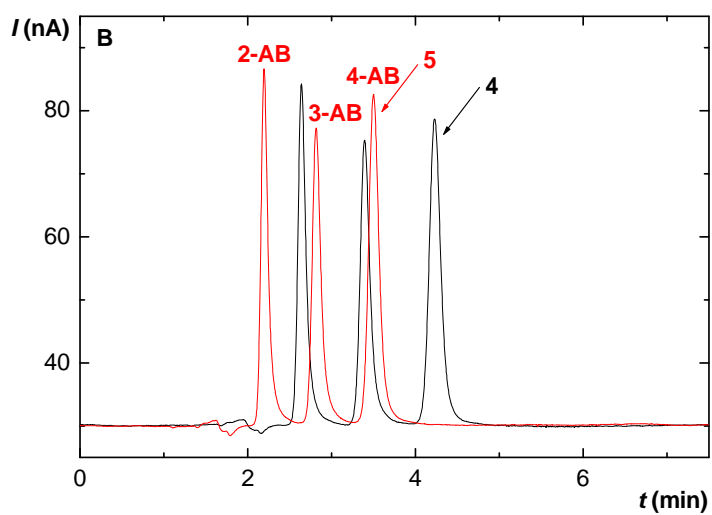
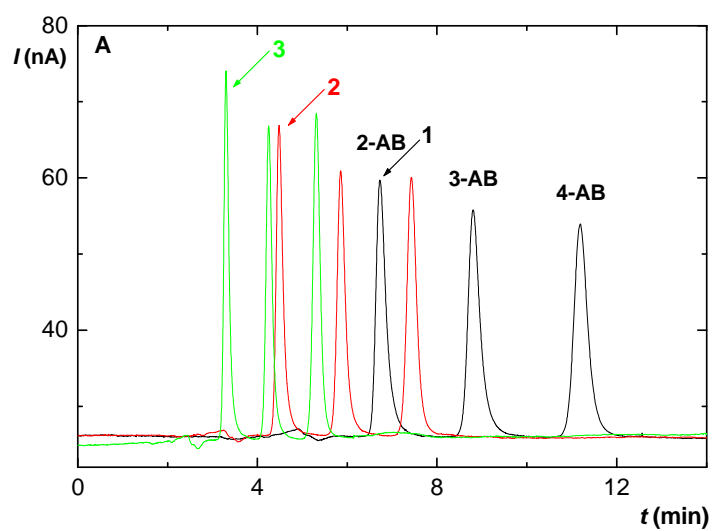
Látka	Směrnice – hodnota koeficientu $x$	Úsek	Korelační koeficient
2-AB	1,67	0,48	0,9960
3-AB	1,60	0,43	0,9877
4-AB	1,62	0,58	0,9935



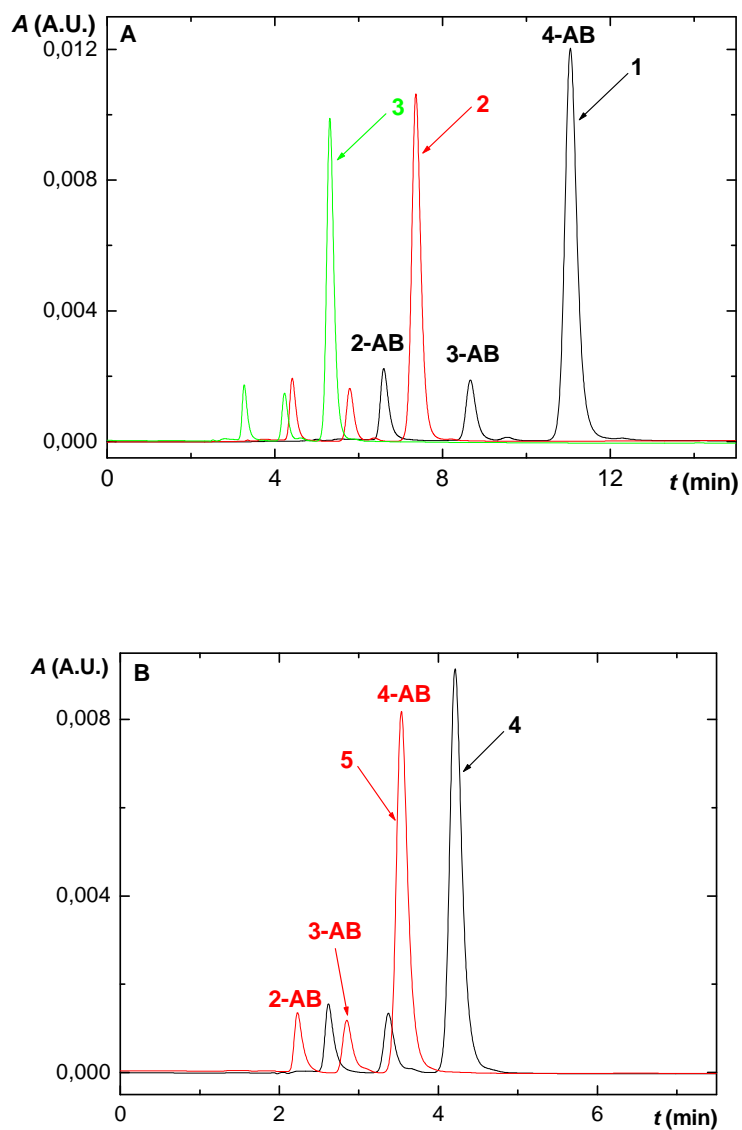
**Obr. 13** Závislost výšky  $I_p$  2-AB (●), 3-AB (□) a 4-AB (▲) a plochy píky  $A_p$  2-AB (●), 3-AB (□) a 4-AB (▲) ( $c = 1.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  pro každý analyt) na průtokové rychlosti mobilní fáze  $F_m$ . Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“,  $E_{\text{det}} = +1,0 \text{ V}$ ,  $V_{\text{inj}} = 20,0 \mu\text{l}$ ,  $l_k = 1,5 \text{ mm}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).



**Obr. 14** Závislost logaritmu výšky píky  $\log I_p$  2-AB (●), 3-AB (□) a 4-AB (▲) ( $c = 1.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  pro každý analyt) na logaritmu průtokové rychlosti mobilní fáze  $\log F_m$ . Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“,  $E_{\text{det}} = +1,0 \text{ V}$ ,  $V_{\text{inj}} = 20,0 \mu\text{l}$ ,  $l_k = 1,5 \text{ mm}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).

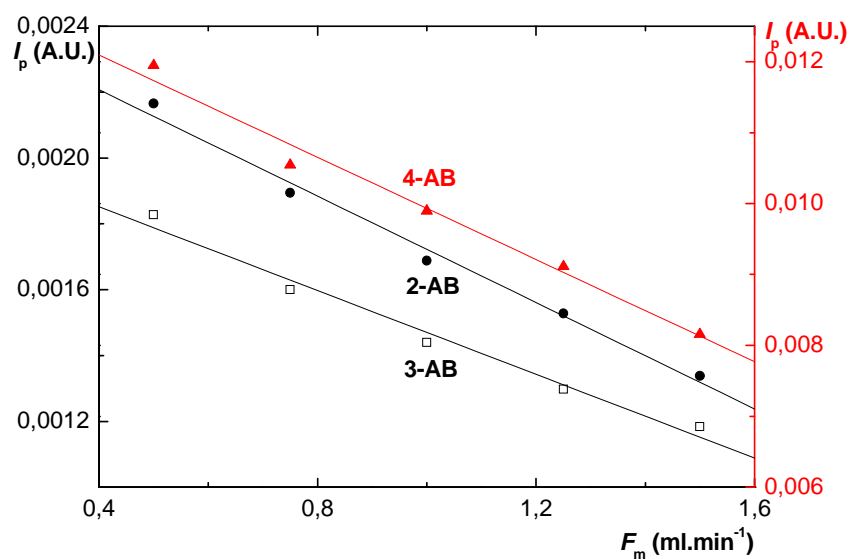


**Obr. 15** Chromatogramy směsi 2-AB, 3-AB a 4-AB ( $c = 1.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  pro každý analyt) získané při různých hodnotách průtokové rychlosti mobilní fáze  $F_m$ . Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“,  $E_{\text{det}} = +1,0 \text{ V}$ ,  $V_{\text{inj}} = 20 \text{ }\mu\text{l}$ ,  $l_k = 1,5 \text{ mm}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).  $F_m$ : 0,50 (1), 0,75 (2), 1,00 (3), 1,25 (4), 1,50 (5)  $\text{ml.min}^{-1}$ .

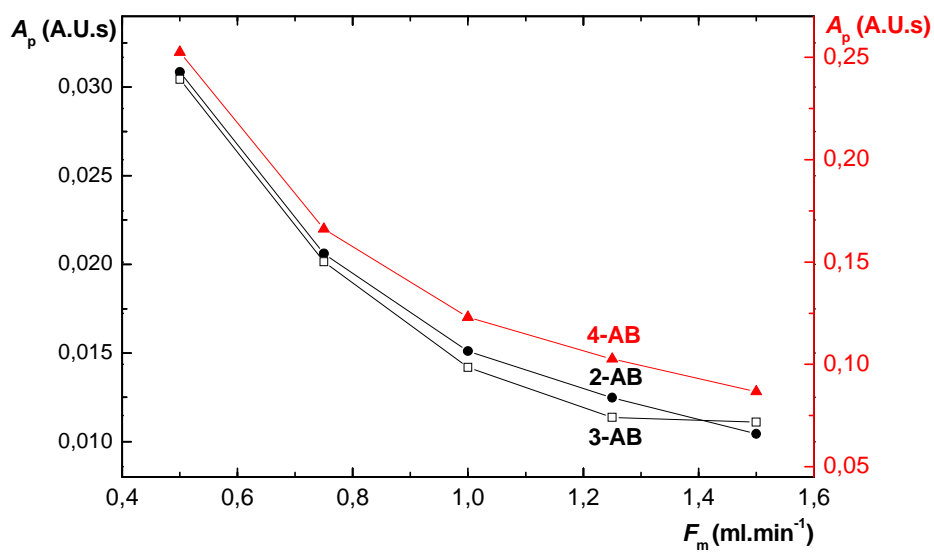


**Obr. 16** Chromatogramy směsi 2-AB, 3-AB a 4-AB ( $c = 1.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  pro každý analyt) získané při různých hodnotách průtokové rychlosti mobilní fáze  $F_m$ . Měřeno metodou HPLC-UV,  $\lambda = 290 \text{ nm}$ ,  $V_{inj} = 20,0 \mu\text{l}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).  $F_m$ : 0,50 (1), 0,75 (2), 1,00 (3), 1,25 (4), 1,50 (5)  $\text{ml.min}^{-1}$ .





**Obr. 17** Závislost výšky píku  $I_p$  2-AB (●), 3-AB (□) a 4-AB (▲) ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  pro každý analyt) na průtokové rychlosti mobilní fáze  $F_m$ . Měřeno metodou HPLC-UV,  $\lambda = 290 \text{ nm}$ ,  $V_{inj} = 20,0 \mu\text{l}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).



**Obr. 18** Závislost plochy píku  $A_p$  2-AB (●), 3-AB (□) a 4-AB (▲) ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  pro každý analyt) na průtokové rychlosti mobilní fáze  $F_m$ . Měřeno metodou HPLC-UV,  $\lambda = 290 \text{ nm}$ ,  $V_{inj} = 20,0 \mu\text{l}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).

**Tab. 4** Retenční časy  $t_r$  2-AB, 3-AB a 4-AB ( $c = 1.10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> pro každý analyt) dosažené při různých hodnotách průtokové rychlosti mobilní fáze  $F_m$ . Měřeno metodami HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“ a HPLC-UVD,  $E_{det} = +1,0$  V,  $V_{inj} = 20,0$   $\mu$ l,  $l = 1,5$  mm,  $\lambda = 290$  nm, mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci 0,01 mol.l<sup>-1</sup> a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).

Látka	UVD		ED	
	$F_m$ (ml.min <sup>-1</sup> )	$t_r$ (min)	$F_m$ (ml.min <sup>-1</sup> )	$t_r$ (min)
2-AB	0,50	6,59	0,50	6,73
3-AB		8,66		8,80
4-AB		11,04		11,18
2-AB	0,75	4,42	0,75	4,48
3-AB		5,80		5,86
4-AB		7,38		7,44
2-AB	1,00	3,27	1,00	3,31
3-AB		4,23		4,27
4-AB		5,30		5,33
2-AB	1,25	2,62	1,25	2,64
3-AB		3,37		3,39
4-AB		4,20		4,22
2-AB	1,50	2,19	1,50	2,20
3-AB		2,41		2,82
4-AB		3,01		3,50

### 3.1.3 Objem vzorku dávkovaného na kolonu

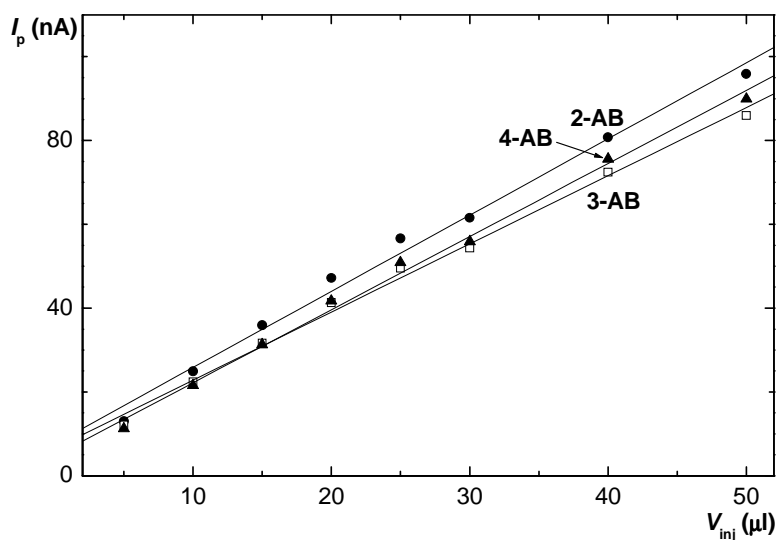
Po zjištění optimálního potenciálu detekce  $E_{det}$  a průtokové rychlosti mobilní fáze  $F_m$  byla provedena optimalizace objemu vzorku dávkovaného na kolonu  $V_{inj}$ . Na kolonu bylo postupně dávkováno 5,0  $\mu$ l až 50,0  $\mu$ l roztoku obsahujícího 2-AB, 3-AB a 4-AB, každý o koncentraci  $1.10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup>. Při optimalizaci byla vyhodnocována  $I_p$  a  $A_p$  stanovovaných látek pro ED i UVD.

Výška píku  $I_p$  2-AB, 3-AB i 4-AB se pro ED lineárně zvyšovala v celém měřeném rozmezí se vzrůstajícím  $V_{inj}$  (Obr. 19). Stejný trend vykazovaly také plochy píků  $A_p$  stanovovaných látek (Obr. 20). Chromatogramy směsi 2-AB, 3-AB a 4-AB získané při různých hodnotách  $V_{inj}$  jsou pro ED na Obr. 21.

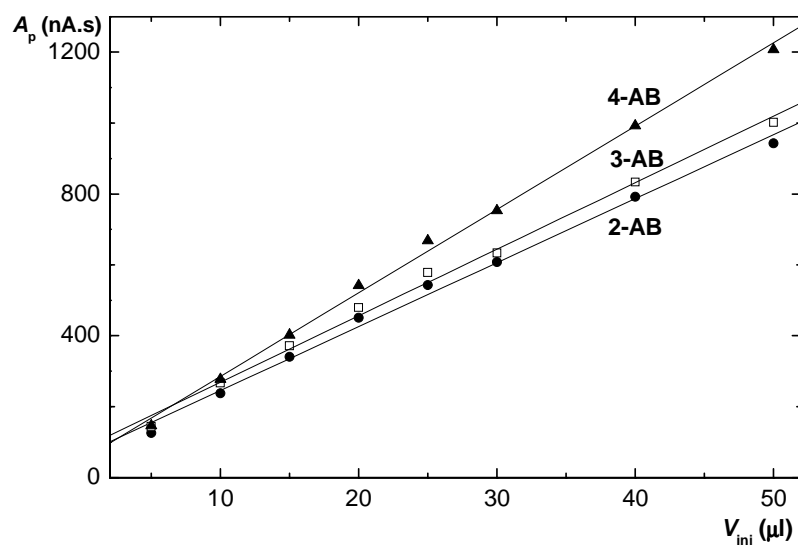
Shodné chování vykazovaly studované analyty při UVD, kdy vzrůst  $I_p$  i  $A_p$  2-AB, 3-AB i 4-AB se vzrůstajícím  $V_{inj}$  lze popsat lineární závislostí. Závislost  $I_p$  studovaných analytů na  $V_{inj}$  při UVD je na Obr. 22., závislost  $A_p$  2-AB, 3-AB a 4-AB na  $V_{inj}$  při UVD

na Obr. 23. Chromatogramy dané směsi získané při různých hodnotách  $V_{inj}$  jsou pro UVD na Obr. 24.

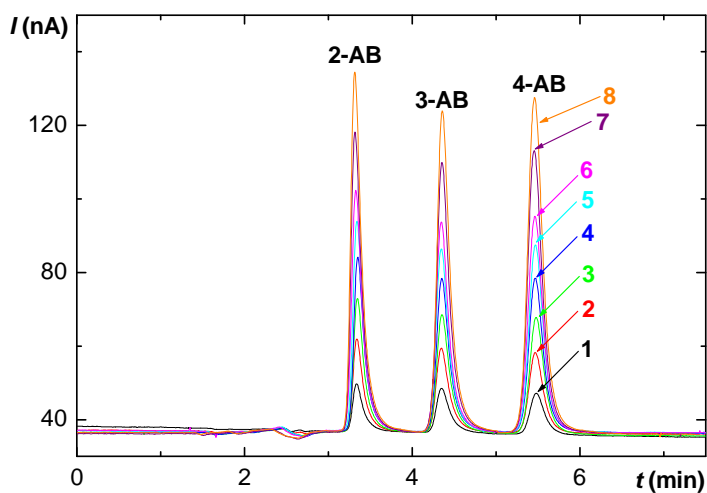
Jelikož při vyšších  $V_{inj}$  docházelo při koncentracích vyšších než  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  ke zhoršení rozlišení píků studovaných analytů a dávkování vyšších objemů je také neopodstatněné z ekonomického hlediska, byl jako optimální zvolen  $V_{inj} = 20,0 \text{ } \mu\text{l}$ .



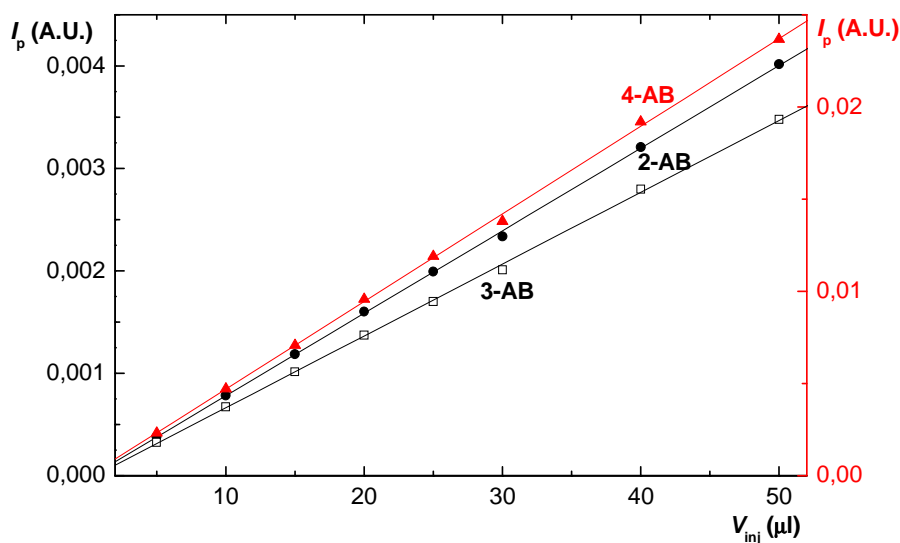
**Obr. 19** Závislost výšky píku  $I_p$  2-AB (●), 3-AB (□) a 4-AB (▲) ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  pro každý analyt 2-AB, 3-AB a 4-AB) na objemu vzorku dávkovaného na kolonu  $V_{inj}$ . Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“,  $E_{det} = +1,0 \text{ V}$ ,  $F_m = 1,0 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $l_k = 1,5 \text{ mm}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).



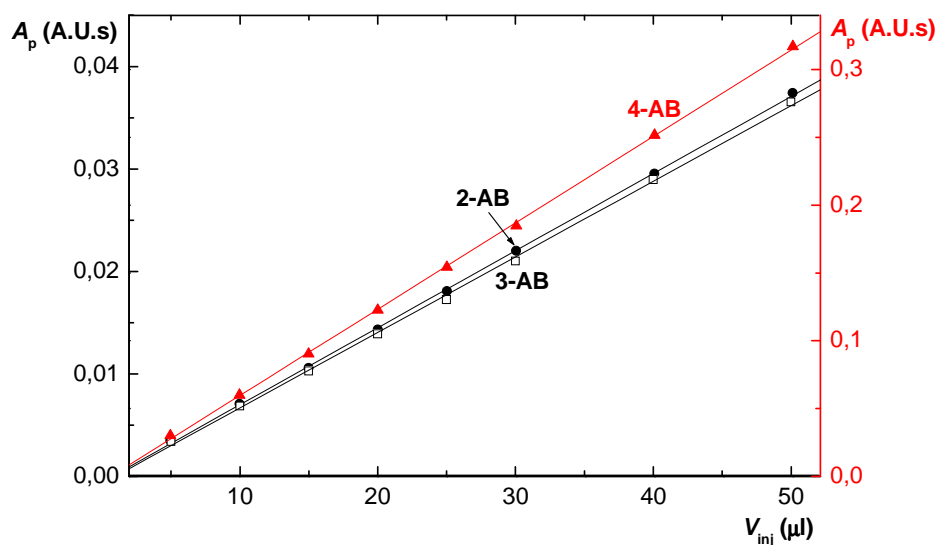
**Obr. 20** Závislost plochy píku  $A_p$  2-AB (●), 3-AB (□) a 4-AB (▲) ( $c = 1.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  pro každý analyt 2-AB, 3-AB a 4-AB) na objemu vzorku dávkovaného na kolonu  $V_{inj}$ . Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“,  $E_{det} = +1,0 \text{ V}$ ,  $F_m = 1,0 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $l_k = 1,5 \text{ mm}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).



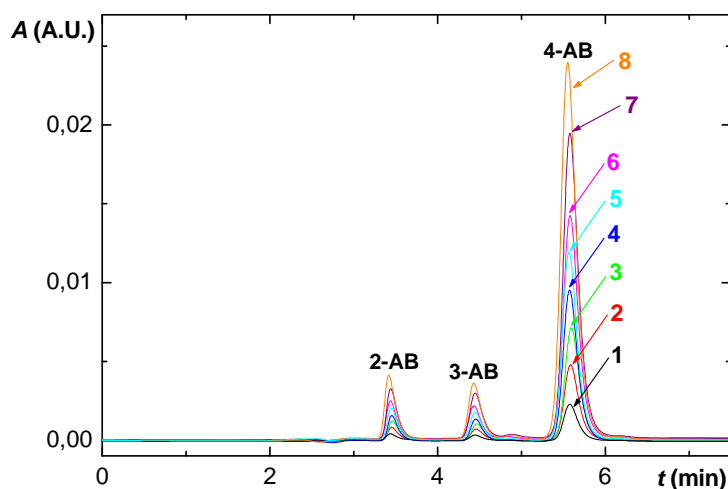
**Obr. 21** Chromatogramy směsi 2-AB, 3-AB a 4-AB ( $c = 1.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  pro každý analyt) získané při různých hodnotách objemu vzorku dávkového na kolonu  $V_{inj}$ . Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“,  $E_{det} = +1,0 \text{ V}$ ,  $F_m = 1,0 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $l_k = 1,5 \text{ mm}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $c 0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).  $V_{inj}$ : 5 (1), 10 (2), 15 (3), 20 (4), 25 (5), 30 (6), 40 (7), 50 (8)  $\mu l$ .



**Obr. 22** Závislost výšky píku  $I_p$  2-AB (●), 3-AB (□) a 4-AB (▲) ( $c = 1.10^{-5}$  mol.l $^{-1}$  pro každý analyt) na objemu vzorku dávkovaného na kolonu  $V_{inj}$ . Měřeno metodou HPLC-UVD,  $\lambda_{det} = 290$  nm,  $F_m = 1,0$  ml.min $^{-1}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci 0,01 mol.l $^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).



**Obr. 23** Závislost plochy píku  $A_p$  2-AB (●), 3-AB (□) a 4-AB (▲) ( $c = 1.10^{-5}$  mol.l $^{-1}$  pro každý analyt) na objemu vzorku dávkovaného na kolonu  $V_{inj}$ . Měřeno metodou HPLC-UVD,  $c = 1.10^{-5}$  mol.l $^{-1}$ ,  $\lambda_{det} = 290$  nm,  $F_m = 1,0$  ml.min $^{-1}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci 0,01 mol.l $^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).



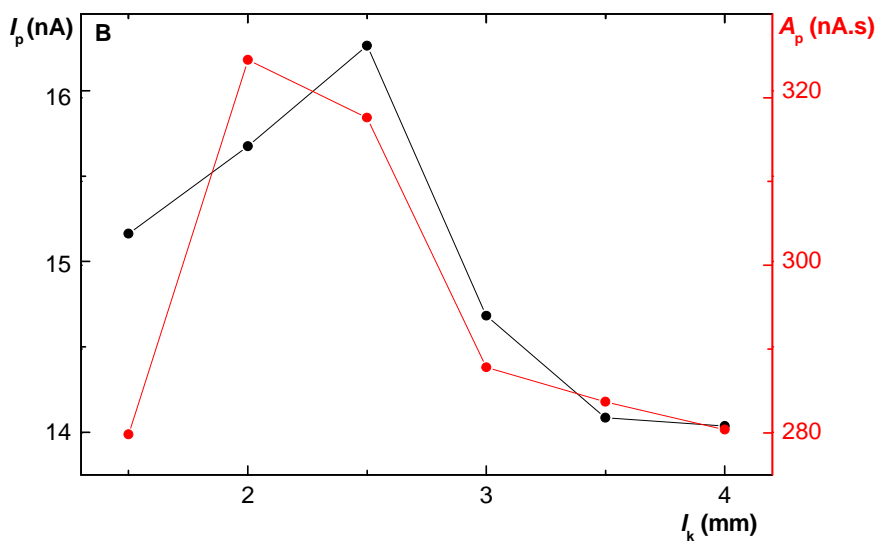
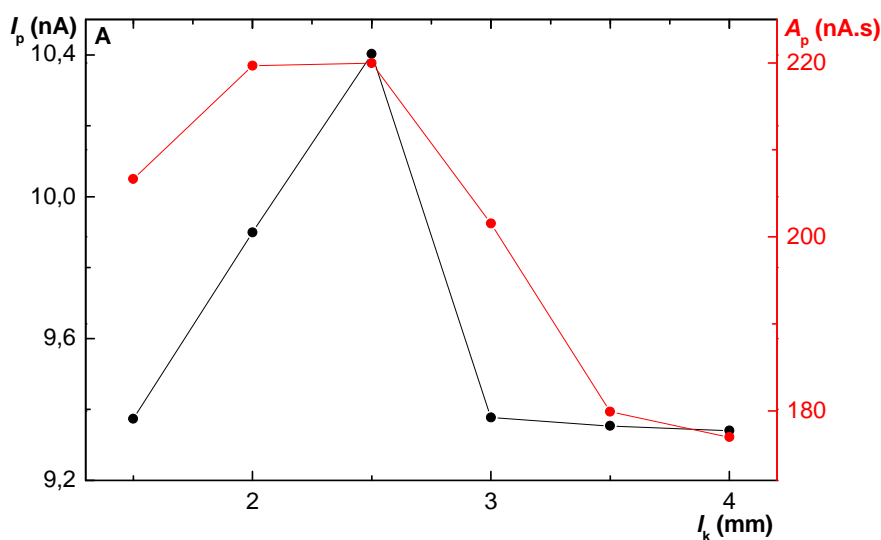
**Obr. 24** Chromatogramy směsi 2-AB, 3-AB a 4-AB ( $c = 1.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  pro každý analyt) získané při různých hodnotách objemu vzorku dávkovaného na kolonu  $V_{\text{inj}}$ . Měřeno metodou HPLC-UVD,  $\lambda_{\text{det}} = 290 \text{ nm}$ ,  $F_m = 1,0 \text{ ml.min}^{-1}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).  $V_{\text{inj}}$ : 5 (1), 10 (2), 15 (3), 20 (4), 25 (5), 30 (6), 40 (7), 50 (8)  $\mu\text{l}$ .

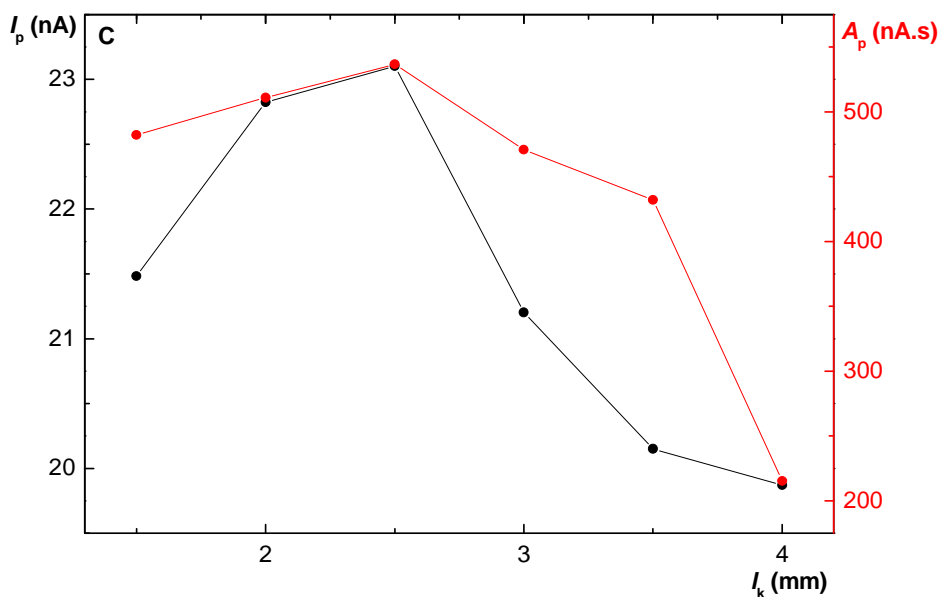
### 3.1.4 Vzdálenost povrchu pracovní elektrody od ústí kapiláry s mobilní fází

Jako poslední byla sledován vliv vzdálenosti povrchu pracovní elektrody od ústí kapiláry s mobilní fází  $l_k$  na signál elektrochemického detektoru. Roztok obsahující 2-AB, 3-AB a 4-AB, každý o koncentraci  $1.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  byl analyzován HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“, přičemž vzdálenost plochy této elektrody od ústí kapiláry, z níž vytékala mobilní fáze se stanovovanými analyty, se postupně zvyšovala v rozmezí  $l_k$  od 1,5 mm do 4,0 mm. Minimální vzdálenost  $l_k = 1,5 \text{ mm}$  je dána umístěním elektrodového materiálu v teflonovém tělu diskové elektrody (viz Obr. 6A) a odpovídá minimální možné vzdálenosti povrchu BDDFE od ústí kapiláry s mobilní fází.

Z výsledku vyplývá, že výška píku  $I_p$  i plocha píku  $A_p$  2-AB a 4-AB stoupaly v rozmezí 1,5 mm až 2,5 mm, kdy dosáhly svého maxima. V rozmezí vzdáleností 3,0 až 4,0 mm byl zaznamenán jejich prudký pokles.  $I_p$  3-AB dosáhla maxima při 2,5 mm, v rozmezí 3,0 až 4,0 mm prudce klesala.  $A_p$  3-AB dosáhla svého maxima při 2,0 mm. Závislost  $I_p$  a  $A_p$  2-AB na  $l_k$  je na Obr. 25.A, 3-AB na Obr. 25.B a 4-AB na Obr. 25.C. Rozdíl minimální a maximální výšky či plochy píku je však relativně malý vzhledem k jejím absolutním

hodnotám, nepřekračuje pro žádný analyt 20 %. Přesto, že nejvyšší odezvu poskytovaly dané látky při  $l_k = 2,0$  či  $2,5$  mm, byla jako optimální hodnota zvolena minimální možná vzdálenost  $l_k = 1,5$  mm, při níž teflonové tělo diskové elektrody, v němž je umístěn elektrodový materiál, přisedá na ústí kapiláry. Tím je zajištěno reprodukovatelné nastavení vzdálenosti bez nutnosti použít pro přesné nastavení vzdálenosti vhodný separátor mezi ústí kapiláry a teflonové tělo elektrody. Tato volba je opodstatněna i relativně malými rozdíly ve výškách a plochách píku v minimu a maximu, jak je vysvětleno výše.





**Obr. 25** Závislost výšky píku  $I_p$  a plochy píku  $A_p$  2-AB (A), 3-AB (B) a 4-AB (C) ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  pro každý analyt 2-AB, 3-AB a 4-AB) na vzdálenosti povrchu BDDFE od ústí kapiláry s mobilní fází  $l_k$ . Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“,  $E_{\text{det}} = +1,0 \text{ V}$ ,  $F_m = 1,0 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $V_{\text{inj}} = 20,0 \text{ } \mu\text{l}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).

### 3.1.5 Shrnutí – optimalizace podmínek

Z výsledků prezentovaných v předchozích kapitolách byly určeny optimální podmínky pro stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB metodami HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“ a HPLC-UVD. Optimální parametry obou metod jsou shrnuty v Tab. 5. Za těchto podmínek byly následně proměřeny kalibrační závislosti v mobilní fázi.



**Tab. 5** Optimální parametry pro stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB metodami HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“ a HPLC-UVD. Mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).

Parametr metody	HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall – jet“	HPLC-UVD
$\lambda$	–	290 nm
$E_{\text{det}} \text{ (V)}$	+1,0	–
$F_{\text{m}} \text{ (ml.min}^{-1}\text{)}$	1,0	1,0
$V_{\text{inj}} \text{ (}\mu\text{l)}$	20	20
$l \text{ (mm)}$	1,5	–

### 3.1.6 Kalibrační závislosti pro přímé stanovení 2-aminobifenyly, 3-aminobifenyly a 4-aminobifenyly metodou HPLC s elektrochemickou a UV detekcí

Po zjištění optimálních podmínek pro stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB metodami HPLC-ED v uspořádání „wall-jet“ a HPLC-UVD byly proměřeny kalibrační závislosti studovaných analytů. Při analýze byla vyhodnocována  $I_p$  a  $A_p$  2-AB, 3-AB a 4-AB pro ED i UVD.

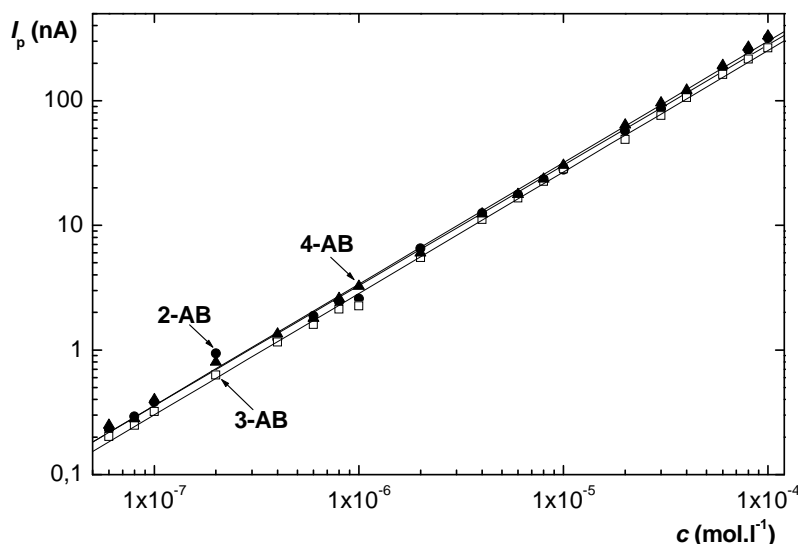
Při stanovení metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“ byly získány kalibrační závislosti vyhodnocené z  $I_p$  a  $A_p$  v koncentračním rozmezí  $(6 - 10000) \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$  pro 2-AB, 3-AB a 4-AB. Závislosti jsou v celém rozmezí lineární, jak je zřejmé z Obr. 26, respektive Obr. 27, kde je pro celé měřené rozmezí koncentrací studovaných analytů zobrazena závislost  $I_p$  respektive  $A_p$  na  $c$  v logaritmickém měřítku. Chromatogramy analyzované směsi zaznamenané v koncentračním rozmezí  $(1 - 10) \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$  jsou pro ilustraci na Obr. 28. Parametry kalibračních přímk 2-AB, 3-AB a 4-AB vyhodnocené z  $I_p$  a  $A_p$  jsou pro jednotlivé koncentrační řady a pro stanovený lineární dynamický rozsah (LDR) uvedeny pro  $I_p$  v Tab. 6, pro  $A_p$  v Tab. 7. Mez detekce  $L_D$  byla počítána pro absolutní výšku proudu šumu  $I_s = 0,04 \text{ nA}$ .

Při stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB metodou HPLC-UVD byly získány kalibrační závislosti vyhodnocené z  $I_p$  a  $A_p$  v koncentračním rozmezí  $(1 - 100) \cdot 10^{-6}$  pro 2-AB,  $(1 - 1000) \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$  pro 3-AB a  $(2 - 10000) \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$  pro 4-AB. Závislost  $I_p$  2-AB, 3-AB a 4-AB na  $c$  v logaritmickém měřítku je na Obr. 29. Závislost  $A_p$  2-AB, 3-AB a 4-AB na  $c$  v logaritmickém měřítku je na Obr. 30. Chromatogramy směsi zaznamenané v koncentračním rozmezí  $(1 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  jsou na Obr. 31, což je také nejnižší řád, v němž lze touto

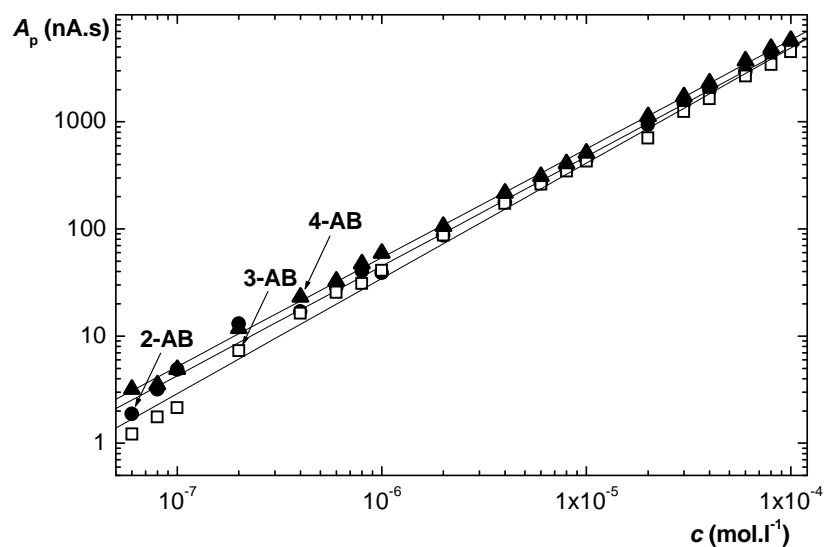
metodou stanovit všechny tři studované látky. Parametry kalibračních závislostí 2-AB, 3-AB a 4-AB vyhodnocené z  $I_p$  a  $A_p$  jsou pro jednotlivé koncentrační řady a pro stanovený LDR uvedeny pro  $I_p$  v Tab. 8, pro  $A_p$  v Tab. 9. Hodnota  $h_s$  byla  $3 \cdot 10^{-5}$  A.U.

Ze získaných výsledků vyplývá, že ED je nejcitlivější pro stanovení 4-AB, jehož kalibrační přímky vyhodnocené z  $I_p$  i  $A_p$  poskytují nejvyšší hodnoty směrnic. Nejnižší hodnoty směrnic naopak vykazují kalibrační přímky 3-AB.  $L_D$  všech tří zkoumaných analytů se příliš neliší a z jejich hodnot vyplývá, že studované látky můžeme při přímém stanovení s využitím ED detekovat při koncentraci až  $4 \cdot 10^{-8}$  mol.l<sup>-1</sup>. Na rozdíl od ED vykazuje UVD nižší citlivost ke stanovení 2-AB, 3-AB v porovnání se 4-AB, což je samozřejmě dáno jednotnou vlnovou délkou detekce. Při UVD byl 2-AB stanoven v koncentračním řádu  $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> kvůli částečné interferenci se signálem nástřiku, zatímco 4-AB poskytoval odezvu i v koncentračním řádu  $10^{-8}$  mol.l<sup>-1</sup>. 3-AB byl při UVD stanoven v koncentračním řádu  $10^{-7}$  mol.l<sup>-1</sup>. Z výše uvedených výsledků plyne, že pro stanovení všech tří látek ve směsi se ED jeví ve srovnání s UVD jako výhodnější, jelikož umožňuje stanovení všech tří zkoumaných látek v koncentračním řádu  $10^{-8}$  mol.l<sup>-1</sup>.

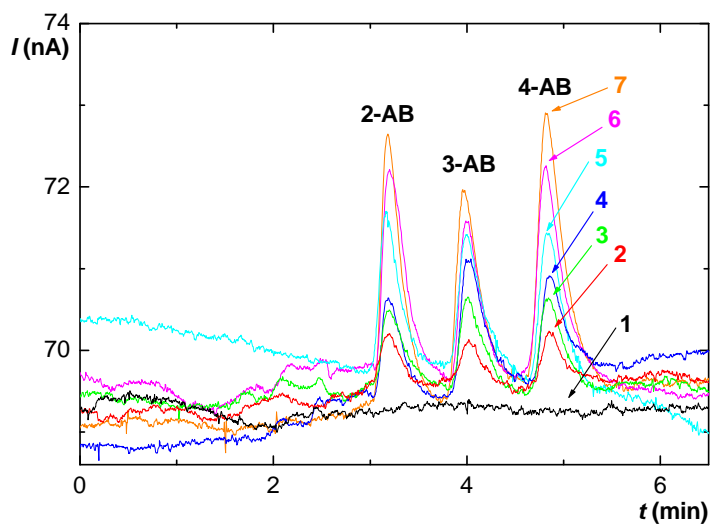
V Tab. 10 jsou shrnuty parametry kalibračních závislostí vyhodnocené z  $I_p$  pro celý LDR získané při stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB metodami HPLC-ED v uspořádání „wall-jet“, HPLC-ED v uspořádání „thin-layer“<sup>19</sup> a HPLC-UVD.



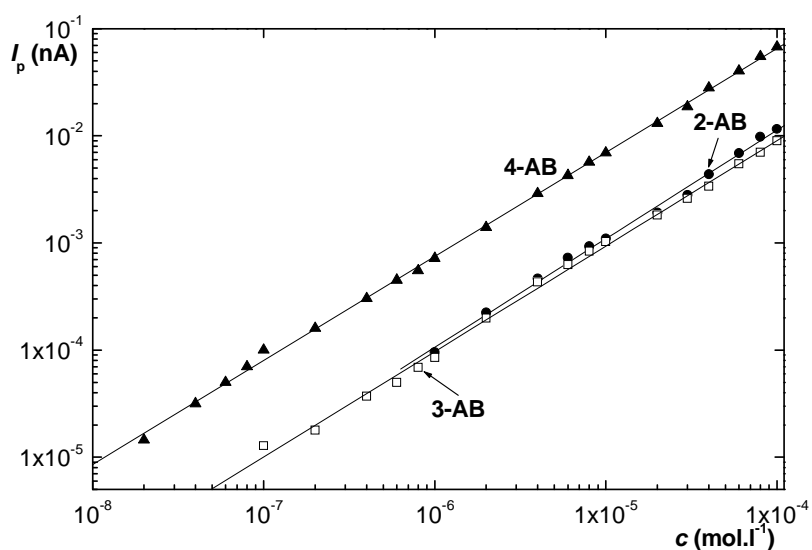
**Obr. 26** Kalibrační závislosti 2-AB (●), 3-AB (□) a 4-AB (▲) pro celý měřený rozsah v logaritmickém měřítku, vyhodnoceno z výšek píků  $I_p$ . Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“,  $E_{det} = +1,0$  V,  $F_m = 1,0$  ml.s<sup>-1</sup>,  $V_{inj} = 20,0$  μl,  $l_k = 1,5$  mm, mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci 0,01 mol.l<sup>-1</sup> a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).



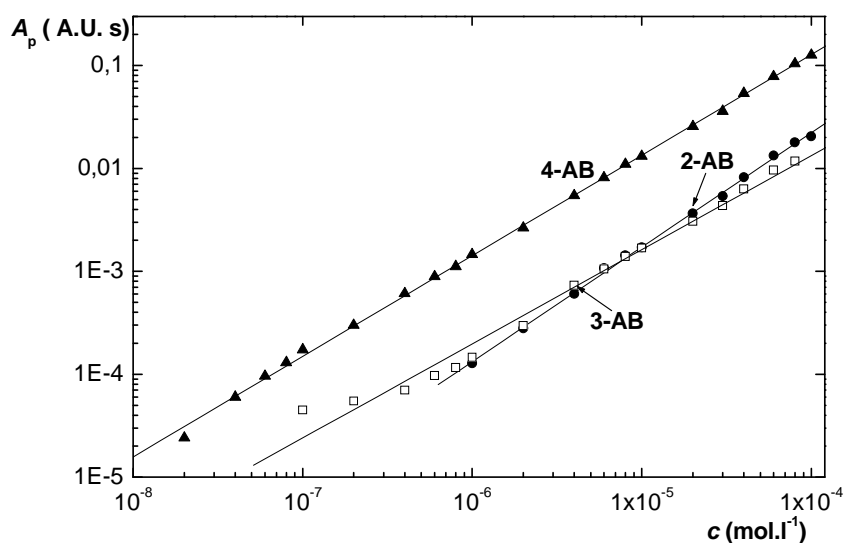
**Obr. 27** Kalibrační závislosti 2-AB (●), 3-AB (□) a 4-AB (▲) pro celý měřený rozsah v logaritmickém měřítku, vyhodnoceno z ploch píků  $A_p$ . Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“,  $E_{\text{det}} = +1,0$  V,  $F_m = 1,0$  ml.s<sup>-1</sup>,  $V_{\text{inj}} = 20,0$  μl,  $l_k = 1,5$  mm, mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci 0,01 mol.l<sup>-1</sup> a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).



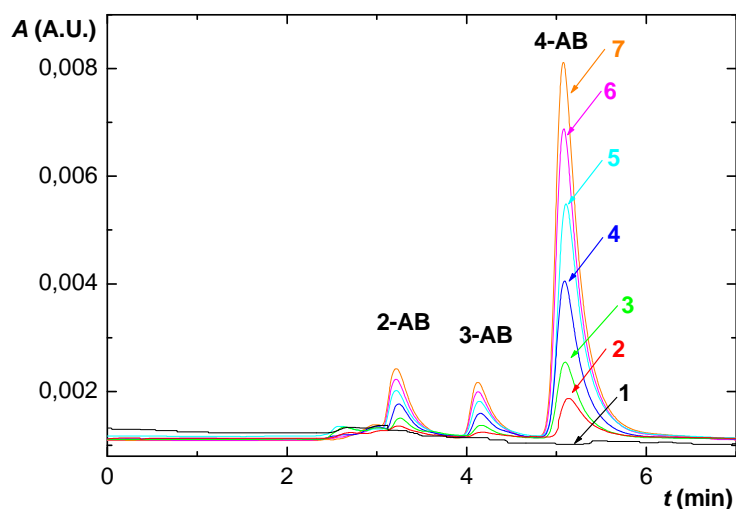
**Obr. 28** Chromatogramy směsi 2-AB, 3-AB a 4-AB, měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“,  $E_{\text{det}} = +1,0$  V,  $F_m = 1,0$  ml.s<sup>-1</sup>,  $V_{\text{inj}} = 20,0$  μl,  $l_k = 1,5$  mm, mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci 0,01 mol.l<sup>-1</sup> a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).  $c$ : 0 (1),  $1 \cdot 10^{-7}$  (2),  $2 \cdot 10^{-7}$  (3),  $4 \cdot 10^{-7}$  (4),  $6 \cdot 10^{-7}$  (5),  $8 \cdot 10^{-7}$  (6),  $10 \cdot 10^{-7}$  (7) mol.l<sup>-1</sup>.



**Obr. 29** Kalibrační závislosti 2-AB (●), 3-AB (□) a 4-AB (▲) pro celý měřený rozsah v logaritmickém měřítku, vyhodnoceno z výšek píků  $I_p$ . Měřeno metodou HPLC-UV,  $\lambda_{\text{det}} = 290 \text{ nm}$ ,  $F_m = 1,0 \text{ ml.s}^{-1}$ ,  $V_{\text{inj}} = 20,0 \text{ } \mu\text{l}$  mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).



**Obr. 30** Kalibrační závislosti 2-AB(●), 3-AB (□) a 4-AB (▲), pro celý měřený rozsah v logaritmickém měřítku, vyhodnoceno z plochy píku  $A_p$ . Měřeno metodou HPLC-UV,  $\lambda_{\text{det}} = 290 \text{ nm}$ ,  $F_m = 1,0 \text{ ml.s}^{-1}$ ,  $V_{\text{inj}} = 20,0 \text{ } \mu\text{l}$  mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).



**Obr. 31** Chromatogramy směsi 2-AB, 3-AB a 4-AB. Měřeno metodou HPLC-UV,  $\lambda_{\text{det}} = 290 \text{ nm}$ ,  $F_m = 1,0 \text{ ml.s}^{-1}$ ,  $V_{\text{inj}} = 20,0 \mu\text{l}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $c \text{ } 0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).  $c$ : 0 (1),  $1 \cdot 10^{-6}$  (2),  $2 \cdot 10^{-6}$  (3),  $4 \cdot 10^{-6}$  (4),  $6 \cdot 10^{-6}$  (5),  $8 \cdot 10^{-6}$  (6),  $10 \cdot 10^{-6}$  (7) .  $\text{mol.l}^{-1}$ .

**Tab. 6** Parametry kalibračních závislostí 2-AB, 3-AB a 4-AB pro jednotlivé koncentrační řády a pro celý LDR, vyhodnoceno z výšek píků  $I_p$ . Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“,  $E_{\text{det}} = +1,0 \text{ V}$ ,  $F_m = 1,0 \text{ ml.s}^{-1}$ ,  $V_{\text{inj}} = 20,0 \mu\text{l}$ ,  $l_k = 1,5 \text{ mm}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).

Látka	Koncentrační rozmezí ( $\text{mol.l}^{-1}$ )	Směrnice ( $\text{nA.mol}^{-1}.\text{l}$ )	Úsek ( $\text{nA}$ )	Korelační koeficient	$L_D$ ( $\text{mol.l}^{-1}$ )
2-AB	$(1 - 10) \cdot 10^{-5}$	$(3,26 \pm 0,07) \cdot 10^6$	$-10,05 \pm 3,88$	0,9989	-----
2-AB	$(1 - 10) \cdot 10^{-6}$	$(2,79 \pm 0,09) \cdot 10^6$	$0,44 \pm 0,52$	0,9981	-----
2-AB	$(1 - 10) \cdot 10^{-7}$	$(2,81 \pm 0,02) \cdot 10^6$	$0,28 \pm 0,12$	0,9901	-----
2-AB	$(6 - 10) \cdot 10^{-8}$	$(3,77 \pm 0,04) \cdot 10^6$	$-0,12 \pm 0,35$	0,9947	$3,2 \cdot 10^{-8}$
<b>2-AB</b>	<b><math>(6 - 10000) \cdot 10^{-8}</math></b>	<b><math>(3,13 \pm 0,03) \cdot 10^6</math></b>	<b><math>-1,64 \pm 1,18</math></b>	<b>0,9990</b>	<b><math>3,8 \cdot 10^{-8}</math></b>
3-AB	$(1 - 10) \cdot 10^{-5}$	$(2,74 \pm 0,05) \cdot 10^6$	$-3,12 \pm 2,40$	0,9993	-----
3-AB	$(1 - 10) \cdot 10^{-6}$	$(2,87 \pm 0,03) \cdot 10^6$	$-0,47 \pm 0,17$	0,9998	-----
3-AB	$(1 - 10) \cdot 10^{-7}$	$(2,45 \pm 0,06) \cdot 10^6$	$0,12 \pm 0,04$	0,9989	-----
3-AB	$(6 - 10) \cdot 10^{-8}$	$(2,95 \pm 0,37) \cdot 10^6$	$0,02 \pm 0,03$	0,9920	$4,1 \cdot 10^{-8}$
<b>3-AB</b>	<b><math>(6 - 10000) \cdot 10^{-8}</math></b>	<b><math>(2,68 \pm 0,02) \cdot 10^6</math></b>	<b><math>-0,13 \pm 0,50</math></b>	<b>0,9996</b>	<b><math>4,5 \cdot 10^{-8}</math></b>
4-AB	$(1 - 10) \cdot 10^{-5}$	$(3,37 \pm 0,06) \cdot 10^6$	$-5,79 \pm 3,43$	0,9992	-----
4-AB	$(1 - 10) \cdot 10^{-6}$	$(3,01 \pm 0,04) \cdot 10^6$	$-0,12 \pm 0,27$	0,9996	-----
4-AB	$(1 - 10) \cdot 10^{-7}$	$(3,07 \pm 0,12) \cdot 10^6$	$0,10 \pm 0,07$	0,9967	-----
4-AB	$(6 - 10) \cdot 10^{-8}$	$(3,77 \pm 0,13) \cdot 10^6$	$0,02 \pm 0,01$	0,9994	$3,2 \cdot 10^{-8}$
<b>4-AB</b>	<b><math>(6 - 10000) \cdot 10^{-8}</math></b>	<b><math>(3,29 \pm 0,03) \cdot 10^6</math></b>	<b><math>-1,26 \pm 0,87</math></b>	<b>0,9995</b>	<b><math>3,7 \cdot 10^{-8}</math></b>

**Tab. 7** Parametry kalibračních závislostí 2-AB, 3-AB a 4-AB pro jednotlivé koncentrační řady a pro celý LDR, vyhodnoceno z ploch píků  $A_p$ . Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“,  $E_{\text{det}} = +1,0$  V,  $F_m = 1,0$  ml.s<sup>-1</sup>,  $V_{\text{inj}} = 20,0$   $\mu$ l,  $l_k = 1,5$  mm, mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci 0,01 mol.l<sup>-1</sup> a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).

Látka	Koncentrační rozmezí (mol.l <sup>-1</sup> )	Směrnice (nA.s.mol <sup>-1</sup> .l)	Úsek (nA.s)	Korelační koeficient
2-AB	(1 - 10).10 <sup>-5</sup>	(5,39 ± 0,11).10 <sup>7</sup>	-143,75 ± 63,61	0,9989
2-AB	(1 - 10).10 <sup>-6</sup>	(4,50 ± 0,05).10 <sup>7</sup>	-3,27 ± 2,85	0,9998
2-AB	(1 - 10).10 <sup>-7</sup>	(4,87 ± 0,29).10 <sup>7</sup>	0,39 ± 1,74	0,9931
2-AB	(6 - 10).10 <sup>-8</sup>	(7,50 ± 0,58).10 <sup>7</sup>	-2,68 ± 0,46	0,9971
<b>2-AB</b>	<b>(6 - 10000).10<sup>-8</sup></b>	<b>(5,22 ± 0,05).10<sup>7</sup></b>	<b>-32,51 ± 17,91</b>	<b>0,9992</b>
3-AB	(1 - 10).10 <sup>-5</sup>	(4,50 ± 0,14).10 <sup>7</sup>	-93,16 ± 65,79	0,9980
3-AB	(1 - 10).10 <sup>-6</sup>	(4,34 ± 0,03).10 <sup>7</sup>	-1,06 ± 2,02	0,9999
3-AB	(1 - 10).10 <sup>-7</sup>	(4,22 ± 0,15).10 <sup>7</sup>	-1,22 ± 0,94	0,9973
3-AB	(6 - 10).10 <sup>-8</sup>	(2,34 ± 0,23).10 <sup>7</sup>	-0,16 ± 0,19	0,9951
<b>3-AB</b>	<b>(6 - 10000).10<sup>-8</sup></b>	<b>(4,31 ± 0,05).10<sup>7</sup></b>	<b>-11,62 ± 13,87</b>	<b>0,9989</b>
4-AB	(1 - 10).10 <sup>-5</sup>	(5,95 ± 0,15).10 <sup>7</sup>	43,99 ± 87,03	0,9984
4-AB	(1 - 10).10 <sup>-6</sup>	(5,21 ± 0,14).10 <sup>7</sup>	-5,28 ± 8,69	0,9985
4-AB	(1 - 10).10 <sup>-7</sup>	(5,96 ± 0,16).10 <sup>7</sup>	-0,98 ± 0,97	0,9986
4-AB	(6 - 10).10 <sup>-8</sup>	(4,27 ± 0,13).10 <sup>7</sup>	0,61 ± 0,10	0,9995
<b>4-AB</b>	<b>(6 - 10000).10<sup>-8</sup></b>	<b>(5,92 ± 0,05).10<sup>7</sup></b>	<b>-16,43 ± 19,01</b>	<b>0,9993</b>

**Tab. 8.** Parametry kalibračních závislostí 2-AB, 3-AB a 4-AB pro jednotlivé koncentrační řady a pro celý LDR, vyhodnoceno z výše píků  $I_p$ . Měřeno metodou HPLC-UV,  $\lambda_{\text{det}} = 290 \text{ nm}$ ,  $F_m = 1,0 \text{ ml.s}^{-1}$ ,  $V_{\text{inj}} = 20,0 \mu\text{l}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).

Látka	Koncentrační rozmezí ( $\text{mol.l}^{-1}$ )	Směrnice ( $\text{A.U.mol}^{-1}.\text{l}$ )	Úsek ( $\text{A.U.}$ )	Korelační koeficient	$L_D$ ( $\text{mol.l}^{-1}$ )
2-AB	$(1 - 10).10^{-5}$	$(1,23 \pm 0,04).10^2$	$(-0,47 \pm 0,24).10^{-3}$	0,9972	-----
2-AB	$(1 - 10).10^{-6}$	$(1,13 \pm 0,04).10^2$	$(0,01 \pm 0,02).10^{-3}$	0,9972	$5,1.10^{-7}$
<b>2-AB</b>	<b><math>(1 - 100).10^{-6}</math></b>	<b><math>(1,18 \pm 0,03).10^2</math></b>	<b><math>(-0,14 \pm 0,11).10^{-3}</math></b>	<b>0,9975</b>	<b><math>5,1.10^{-7}</math></b>
3-AB	$(1 - 10).10^{-5}$	$(0,87 \pm 0,02).10^2$	$(0,07 \pm 0,10).10^{-3}$	0,9986	-----
3-AB	$(1 - 10).10^{-6}$	$(1,05 \pm 0,02).10^2$	$(-0,01 \pm 0,01).10^{-3}$	0,9994	-----
3-AB	$(1 - 10).10^{-7}$	<b><math>(0,82 \pm 0,02).10^2</math></b>	$(0,01 \pm 0,01).10^{-3}$	0,9986	$7,3.10^{-7}$
<b>3-AB</b>	<b><math>(1 - 1000).10^{-7}</math></b>	<b><math>(0,88 \pm 0,01).10^2</math></b>	<b><math>(0,03 \pm 0,03).10^{-3}</math></b>	<b>0,9993</b>	<b><math>6,8.10^{-7}</math></b>
4-AB	$(1 - 10).10^{-5}$	$(6,84 \pm 0,11).10^2$	$(-0,41 \pm 0,66).10^{-3}$	0,9993	-----
4-AB	$(1 - 10).10^{-6}$	$(7,02 \pm 0,09).10^2$	$(0,02 \pm 0,05).10^{-3}$	0,9997	-----
4-AB	$(1 - 10).10^{-7}$	$(6,79 \pm 0,18).10^2$	$(0,02 \pm 0,01).10^{-3}$	0,9986	-----
<b>4-AB</b>	<b><math>(2 - 10).10^{-8}</math></b>	<b><math>(10,47 \pm 0,71).10^2</math></b>	<b><math>(-0,01 \pm 0,01).10^{-3}</math></b>	<b>0,9930</b>	<b><math>5,7.10^{-8}</math></b>
<b>4-AB</b>	<b><math>(2 - 10000).10^{-8}</math></b>	<b><math>(6,87.10^2 \pm 0,07).10^2</math></b>	<b><math>(-0,04 \pm 0,22).10^{-3}</math></b>	<b>0,9991</b>	<b><math>8,7.10^{-8}</math></b>

**Tab. 9** Parametry kalibračních závislostí 2-AB, 3-AB a 4-AB pro jednotlivé koncentrační řady a pro celý LDR, vyhodnoceno z ploch píků  $A_p$  při přímém stanovení za optimalizovaných podmínek. Měřeno metodou HPLC-UV,  $\lambda_{\text{det}} = 290 \text{ nm}$ ,  $F_m = 1,0 \text{ ml.s}^{-1}$ ,  $V_{\text{inj}} = 20,0 \mu\text{l}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $c 0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).

Látka	Koncentrační rozmezí ( $\text{mol.l}^{-1}$ )	Směrnice ( $\text{A.U.s.mol}^{-1}.\text{l}$ )	Úsek ( $\text{A.U.}$ )	Korelační koeficient
2-AB	$(1 - 10).10^{-5}$	$(2,20 \pm 0,09).10^3$	$(-0,60 \pm 0,51).10^{-2}$	0,9959
2-AB	$(1 - 10).10^{-6}$	$(1,82 \pm 0,06).10^3$	$(-0,07 \pm 0,04).10^{-2}$	0,9976
<b>2-AB</b>	<b><math>(1 - 100).10^{-6}</math></b>	<b><math>(2,16 \pm 0,5).10^3</math></b>	<b><math>(0,32 \pm 0,21).10^{-2}</math></b>	<b>0,9975</b>
3-AB	$(1 - 10).10^{-5}$	$(1,49 \pm 0,06).10^3$	$(0,15 \pm 0,28).10^{-2}$	0,9968
3-AB	$(1 - 10).10^{-6}$	$(1,73 \pm 0,05).10^3$	$(-0,01 \pm 0,03).10^{-2}$	0,9983
3-AB	$(4 - 10).10^{-7}$	$(1,11 \pm 0,05).10^3$	$(0,03 \pm 0,01).10^{-2}$	0,9952
<b>3-AB</b>	<b><math>(4 - 1000).10^{-7}</math></b>	<b><math>(1,53 \pm 0,02).10^3</math></b>	<b><math>(0,07 \pm 0,07).10^{-2}</math></b>	<b>0,9986</b>
4-AB	$(1 - 10).10^{-5}$	$(1,28 \pm 0,03).10^4$	$(0,38 \pm 1,49).10^{-2}$	0,9989
4-AB	$(1 - 10).10^{-6}$	$(1,34 \pm 0,02).10^4$	$(0,02 \pm 0,15).10^{-2}$	0,9993
4-AB	$(1 - 10).10^{-7}$	$(1,41 \pm 0,03).10^4$	$(0,03 \pm 0,02).10^{-2}$	0,9989
4-AB	$(2 - 10).10^{-8}$	$(1,84 \pm 0,14).10^4$	$(-0,01 \pm 0,01).10^{-2}$	0,9992
<b>4-AB</b>	<b><math>(2 - 10000).10^{-8}</math></b>	<b><math>(1,28 \pm 0,08).10^4</math></b>	<b><math>(1,18.10^{-2} \pm 0,28).10^{-2}</math></b>	<b>0,9996</b>

**Tab. 10** Souhrn parametrů kalibračních závislostí 2-AB, 3-AB a 4-AB, vyhodnoceno z výšek píků  $I_p$ . Měřeno metodou HPLC-ED na BDDFE v uspořádání wall-jet (tato práce) a v tenkovrstvém uspořádání<sup>19</sup> a HPLC-UV,  $F_m = 1,0 \text{ ml.s}^{-1}$ ,  $V_{inj} = 20,0 \text{ } \mu\text{l}$ , mobilní fáze: Methanol, acetonitril, octanový pufr o koncentraci  $c = 0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v).  $E_{det} = 1,0 \text{ V}$ ,  $l_k = 1,5 \text{ mm}$ ,  $\lambda_{det} = 290 \text{ nm}$ ,

Látka, detekce	LDR ( $\text{mol.l}^{-1}$ )	Směrnice <sup>a</sup>	Úsek <sup>b</sup>	Korelační koeficient	$L_D$ ( $\text{mol.l}^{-1}$ )
2-AB, UVD	$(1 - 100).10^{-6}$	$(1,18 \pm 0,03).10^2$	$(-0,14 \pm 0,11).10^{-3}$	0,9975	$5,1.10^{-7}$
2-AB, ED „wall-jet“	$(6 - 10000).10^{-8}$	$(3,13 \pm 0,03).10^6$	$-1,64 \pm 1,18$	0,9990	$3,8.10^{-8}$
2-AB, ED „thin-layer“	$(4 - 100).10^{-7}$	$(13,5 \pm 0,05).10^6$	$-2,23 \pm 0,92$	0,9911	$2,1.10^{-7}$
3-AB, UVD	$(1 - 1000).10^{-7}$	$(0,88 \pm 0,01).10^2$	$(0,03 \pm 0,03).10^{-3}$	0,9993	$7,3.10^{-7}$
3-AB, ED „wall-jet“	$(6 - 10000).10^{-8}$	$(2,68 \pm 0,02).10^6$	$-0,13 \pm 0,50$	0,9996	$4,4.10^{-8}$
3-AB, ED „thin-layer“	$(2 - 100).10^{-7}$	$(8,56 \pm 0,03).10^6$	$-1,08 \pm 0,7$	0,9904	$3,2.10^{-7}$
4-AB, UVD	$(2 - 10000).10^{-8}$	$(6,87 \pm 0,07).10^2$	$(-0,04 \pm 0,22).10^{-3}$	0,9991	$8,7.10^{-8}$
4-AB, ED „wall-jet“	$(6 - 10000).10^{-8}$	$(3,29 \pm 0,03).10^6$	$-1,26 \pm 0,87$	0,9995	$3,6.10^{-8}$
4-AB, ED „thin-layer“	$(2 - 100).10^{-7}$	$(5,28 \pm 0,01).10^6$	$-0,69 \pm 0,2$	0,9925	$5,1.10^{-7}$

<sup>a</sup> pro ED v jednotkách ( $\text{nA.mol}^{-1}.\text{l}$ ), pro UVD v jednotkách ( $\text{nA.mol}^{-1}.\text{l}$ )

<sup>b</sup> pro ED v jednotkách (nA), pro UVD v jednotkách (A.U.)

### 3.1.7 Shrnutí – kalibrační závislosti

Ze srovnání mezí detekce (viz. Tab. 10) 2-AB, 3-AB a 4-AB získaných při stanovení metodami HPLC-ED v uspořádání „wall-jet“, HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „thin-layer“ a HPLC-UV vyplývá, že nejlepších výsledků bylo dosaženo při stanovení studovaných látek metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“ použité v této práci. Při detekci touto metodou byly získány meze detekce v koncentračním řádu  $10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$  pro všechny tři analyty. S tenkovrstvým uspořádáním ampérometrického detektoru byly získány  $L_D$



v koncentračním řádu  $10^{-7}$  mol.l<sup>-1</sup>. V porovnání s metodou HPLC-UV, která pro 2-AB vykazovala mez detekce v koncentračním řádu  $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup>, se tak obě uspořádání ampérometrických detektorů ED jeví jako vhodnější pro analýzu nižších koncentrací studovaných analytů. Zároveň lze předpokládat, že elektrochemická detekce bude v mnohých případech selektivnější, neboť v UV oblasti absorbuje celá řada organických sloučenin, ale jen některé jsou elektrochemicky oxidovatelné při potenciálech kolem +1,0 V používaných v této diplomové práci a bakalářské práci<sup>25</sup>. Elektrochemickou detekcí by například šly selektivně stanovit aminoderiváty bifenyly jako metabolity ve směsi přítomných nitroderivátů.

### **3.2 Stanovení 2-aminobifenyly, 3-aminobifenyly a 4-aminobifenyly ve směsi metodou diferenční pulsní voltametrie**

Při stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB ve směsi metodou DPV bylo nejdříve nutné nalézt optimální pH BR pufru, tj. pH, při němž dané látky vykazují nejvyšší rozdíl potenciálů píků  $\Delta E_p$ . Voltametrické chování 2-AB, 3-AB a 4-AB na BDD filmu bylo již dříve v naší laboratoři studováno<sup>19,29</sup>. Z práce<sup>19</sup>, kde byla studována pro každý analyt samostatně závislost polohy a výšky píků na pH základního elektrolytu, bylo zjištěno, že největší  $\Delta E_p$  vykazuje 2-AB a 3-AB v roztoku BR pufru o pH 2,0, což je zároveň nejvhodnější pH pro stanovení všech tří látek ve směsi, 2-AB a 4-AB v roztoku BR pufru o pH 12,0 a 3-AB a 4-AB také v roztoku BR pufru o pH 12,0. Hodnoty potenciálů píku  $E_p$  2-AB, 3-AB a 4-AB, získané při různých hodnotách pH BR pufru, jsou shrnuty v Tab. 11. V této diplomové práci bylo experimentálně ověřeno, zda jsou pH vybraná na základě práce<sup>19</sup> vhodná pro stanovení jednotlivých dvojic analytů ve směsi a stanovení směsi všech tří analytů. Pokud bylo stanovení ve směsi umožněno, byly proměřeny kalibrační závislosti a stanoveny meze detekce pro zúčastněné aminobifenyly.

Nejprve byla testována možnost stanovení 2-AB a 3-AB ve směsi v BR pufru o pH 2,0. Naměřené voltamogramy jednotlivých analytů a voltamogram jejich směsi je na Obr. 32. Vyplývá z něj, že oproti předpokladům  $\Delta E_p$  2-AB a 3-AB v BR pufru o pH 2,0 je příliš malý (100 mV), dochází ke vzájemné interferenci obou analytů a vzniku směsného píku a nelze je tak ve směsi sebe danou metodou účinně stanovit.

Při analýze směsi obsahující 2-AB a 4-AB (viz Obr. 33), resp. 3-AB a 4-AB (viz. Obr. 34) v BR pufru o pH 12,0 a koncentraci každého analytu  $1 \cdot 10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> byly  $\Delta E_p$  dostatečně

velké, nedocházelo k vzájemnému ovlivnění výšky a polohy píků při směsném stanovení, a tak bylo možné vyhodnotit výšky píků obou látek ve směsi a získat jejich kalibrační závislosti. Ty byly proměřeny pro sérii kalibračních roztoků obsahující vždy konstantní koncentraci prvního analytu a zvyšující se koncentraci druhého analytu a naopak.

Při stanovení 2-AB a 4-AB metodou DPV v prostředí BR pufru o pH 12,0 byly potenciály píků 620 mV pro 2-AB a 480 mV pro 4-AB, tzn. dostatečný rozdíl  $\Delta E_p$ , jehož hodnota byla 149.

Při proměřování kalibračních závislostí byla vyhodnocována výška píku 2-AB  $I_{2-AB}$  a 4-AB  $I_{4-AB}$ , přičemž byly získány kalibrační závislosti v koncentračním rozmezí  $(4 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  pro 2-AB i 4-AB. Kalibrační závislosti 2-AB získané při jeho měnění se koncentrací  $c_{2-AB}$  a při konstantních hodnotách koncentrace 4-AB  $c_{4-AB}$  jsou uvedeny na Obr. 35. Voltamogramy směsi obsahující 2-AB a 4-AB při měnění se  $c_{2-AB}$  a konstantní  $c_{4-AB}$  ( $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ ) jsou pro ukázkou uvedeny na Obr. 36. Parametry kalibračních závislostí získané za stejných podmínek jsou uvedeny v Tab. 12. Kalibrační přímky 4-AB vyhodnocené při měnění se  $c_{4-AB}$  a při konstantních hodnotách  $c_{2-AB}$  jsou uvedeny na Obr. 37. Příklad Voltamogramů směsi 2-AB a 4-AB získané při měnění se  $c_{4-AB}$  a konstantní  $c_{2-AB}$  ( $10 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ ) jsou na Obr. 38. Parametry kalibračních závislostí získané za stejných podmínek jsou uvedeny v Tab. 13.

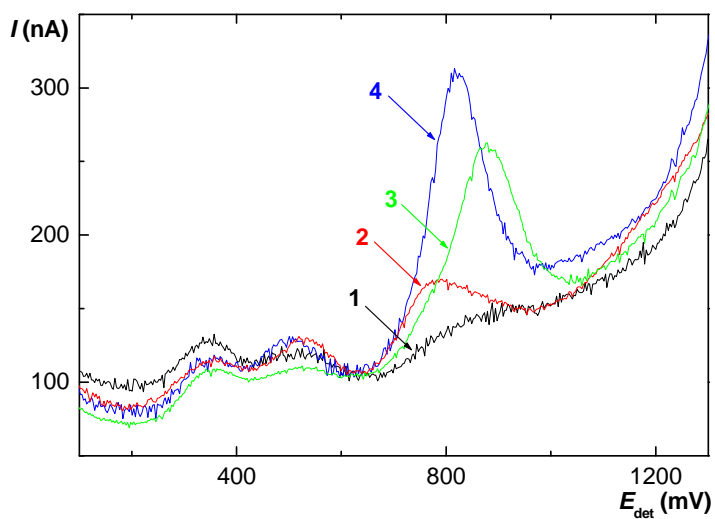
Při stanovení 3-AB a 4-AB metodou DPV v prostředí BR pufru o pH 12,0 byly potenciály píků 590 mV pro 3-AB a 430 mV pro 4-AB, tzn. dostatečný rozdíl  $\Delta E_p$ , jehož hodnota byla 124 mV.

Při stanovení 3-AB a 4-AB metodou DPV v prostředí BR pufru o pH 12,0 byla vyhodnocována výška píku 3-AB  $I_{3-AB}$  a 4-AB  $I_{4-AB}$ . Pro oba analyty byly získány kalibrační závislosti v koncentračním rozmezí  $(4 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ . Kalibrační závislosti 3-AB vyhodnocené při měnění se  $c_{3-AB}$  a konstantní  $c_{4-AB}$  jsou uvedeny na Obr. 39. Voltamogramy směsi 3-AB a 4-AB při měnění se  $c_{3-AB}$  a konstantní  $c_{4-AB}$  ( $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ ) jsou ukázány na Obr. 40. Parametry kalibračních závislostí získané za stejných podmínek jsou uvedeny v Tab. 14. Kalibrační přímky 4-AB vyhodnocené při měnění se  $c_{4-AB}$  a konstantní  $c_{3-AB}$  jsou uvedeny na Obr. 41. Voltamogramy této směsi získané při měnění se  $c_{4-AB}$  a konstantní  $c_{3-AB}$  ( $10 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ ) jsou pro ukázkou uvedeny na Obr. 42. Parametry kalibračních závislostí získané za stejných podmínek jsou uvedeny v Tab. 15.

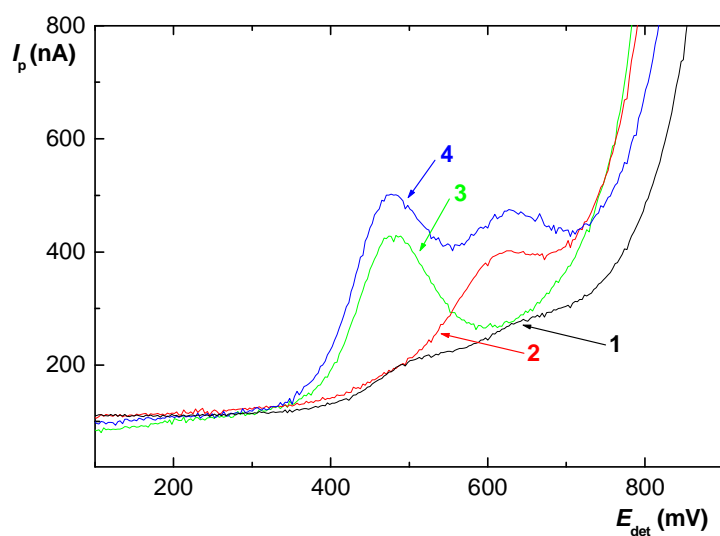
Absolutní hodnota výšky šumu byla při těchto měřeních 1,0 nA.

**Tab. 11** Hodnoty potenciálů  $E_p$  pro hlavní oxidačního pík 2-AB, 3-AB a 4-AB (měřeno proti referentní argentchloridové elektrodě (3 mol.l<sup>-1</sup> KCl) typu RAE 113) v prostředí BR pufru o příslušném pH. Měřeno metodou DPV na BDDFE. Převzato z práce <sup>19</sup>.

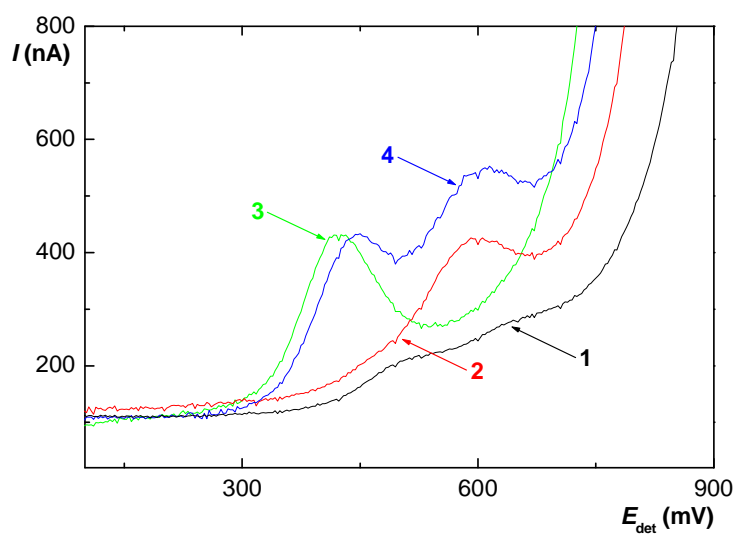
pH BR pufru	$E_{det}$ 2-AB (mV)	$E_{det}$ 3-AB (mV)	$E_{det}$ 4-AB (mV)
2,0	830	915	777
3,0	759	830	698
4,0	725	780	625
5,0	713	702	583
6,0	700	728	578
7,0	690	710	579
8,0	659	683	570
9,0	621	650	543
10,0	590	614	509
11,0	568	574	453
12,0	556	531	407



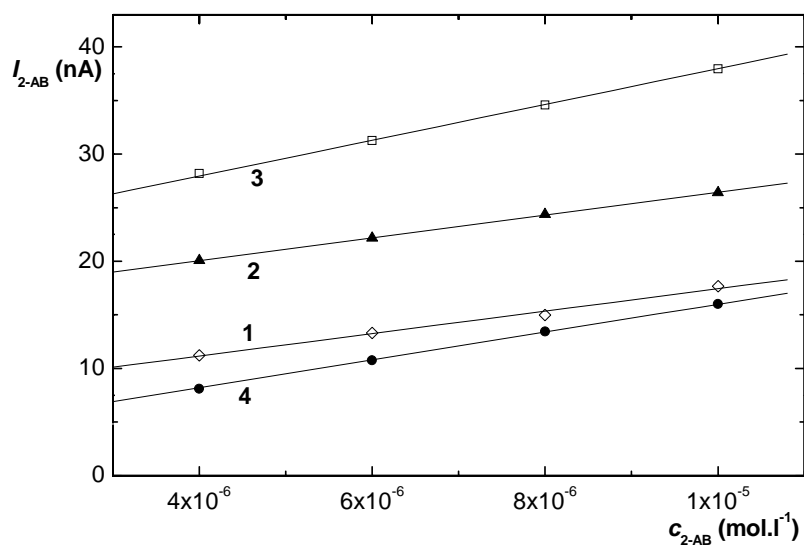
**Obr. 32** Voltamogramy základního elektrolytu (1), 2-AB (2), 3-AB (3) a směsi obsahující 2-AB s 3-AB (4), každý o koncentraci 1.10<sup>-5</sup> mol.l<sup>-1</sup>. Měřeno metodou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 2,0.



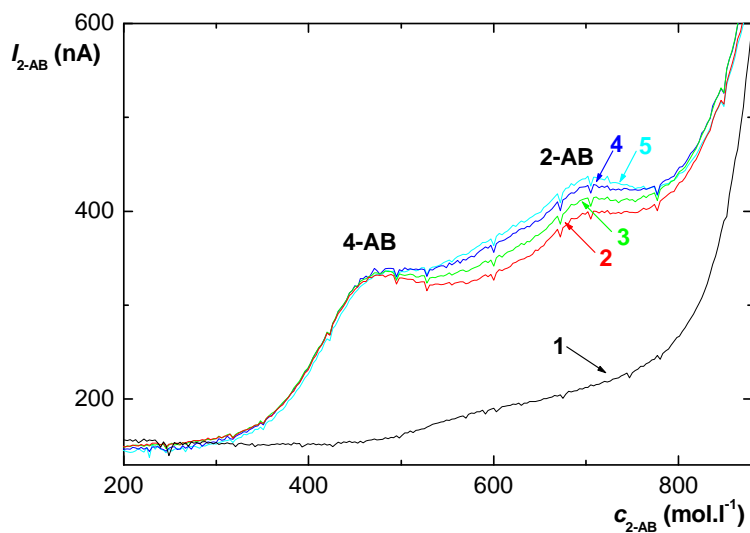
**Obr. 33** Voltamogramy základního elektrolytu (1), 2-AB (2), 4-AB (3) a směsi obsahující 2-AB s 4-AB (4), každý o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ . Měřeno metodou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 12,0.



**Obr. 34** Voltamogramy základního elektrolytu (1), 3-AB (2), 4-AB (3) a směsi obsahující 3-AB s 4-AB (4), každý o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ . Měřeno metodou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 12,0.



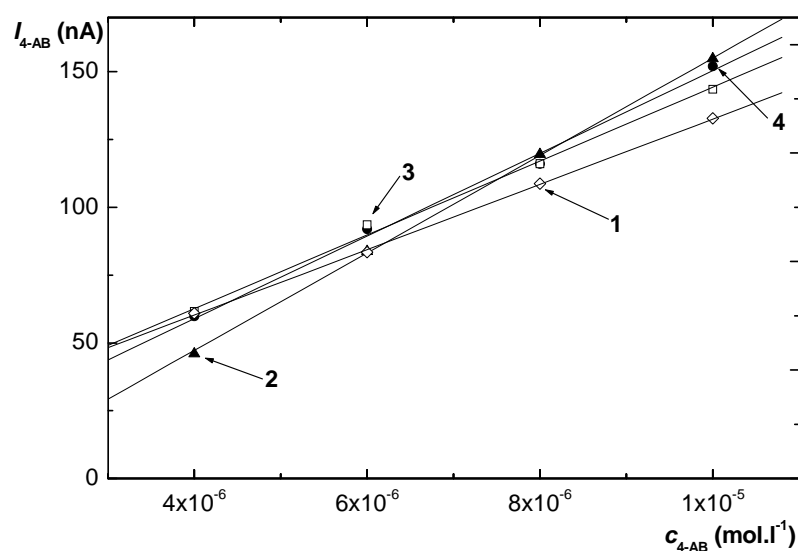
**Obr. 35** Kalibrační závislosti 2-AB v koncentračním rozmezí  $(4 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ , vyhodnoceno z výšky píku 2-AB  $I_{2-AB}$  při měnící se koncentraci 2-AB  $c_{2-AB}$  a při konstantní koncentraci 4-AB  $c_{4-AB}$ . Měřeno metodou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 12,0.  $c_{4-AB}$ :  $4 \cdot 10^{-6}$  (1),  $6 \cdot 10^{-6}$  (2),  $8 \cdot 10^{-6}$  (3),  $10 \cdot 10^{-6}$  (4)  $\text{mol.l}^{-1}$ .



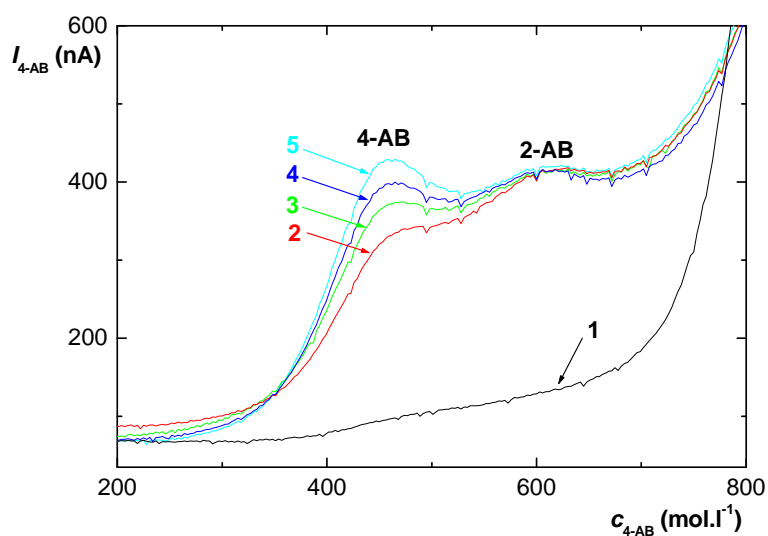
**Obr. 36** Voltamogramy směsi 2-AB a 4-AB získané v koncentračním rozmezí  $(4 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  při měnící se koncentraci 2-AB  $c_{2-AB}$  a při konstantní koncentraci 4-AB  $c_{4-AB} = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ . Měřeno metodou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 12,0. Základní elektrolyt (1),  $c_{2-AB}$ :  $4 \cdot 10^{-6}$  (2),  $6 \cdot 10^{-6}$  (3),  $8 \cdot 10^{-6}$  (4),  $10 \cdot 10^{-6}$  (5)  $\text{mol.l}^{-1}$ .

**Tab. 12** Parametry kalibračních závislostí 2-AB v koncentračním rozmezí  $(4 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ , vyhodnoceno z výšky píku 2-AB  $I_{2-AB}$  při měnící se koncentraci 2-AB  $c_{2-AB}$  a při konstantní koncentraci 4-AB  $c_{4-AB}$ . Měřeno metodou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 12,0.

$c_{2-AB} (\text{mol.l}^{-1})$	$c_{4-AB} (\text{mol.l}^{-1})$	Směrnice ( $\text{nA.mol}^{-1}.\text{l}$ )	Úsek ( $\text{nA}$ )	Korelační koeficient	$L_D$ ( $\text{mol.l}^{-1}$ )
$(4 - 10) \cdot 10^{-6}$	$10 \cdot 10^{-6}$	$(1,30 \pm 0,01) \cdot 10^6$	$3,03 \pm 0,09$	0,9998	$2,3 \cdot 10^{-6}$
	$8 \cdot 10^{-6}$	$(1,67 \pm 0,03) \cdot 10^6$	$21,26 \pm 0,17$	0,9996	$1,8 \cdot 10^{-6}$
	$6 \cdot 10^{-6}$	$(1,07 \pm 0,01) \cdot 10^6$	$15,79 \pm 0,05$	0,9999	$2,8 \cdot 10^{-6}$
	$4 \cdot 10^{-6}$	$(1,04 \pm 0,04) \cdot 10^6$	$6,97 \pm 0,26$	0,9979	$2,9 \cdot 10^{-6}$



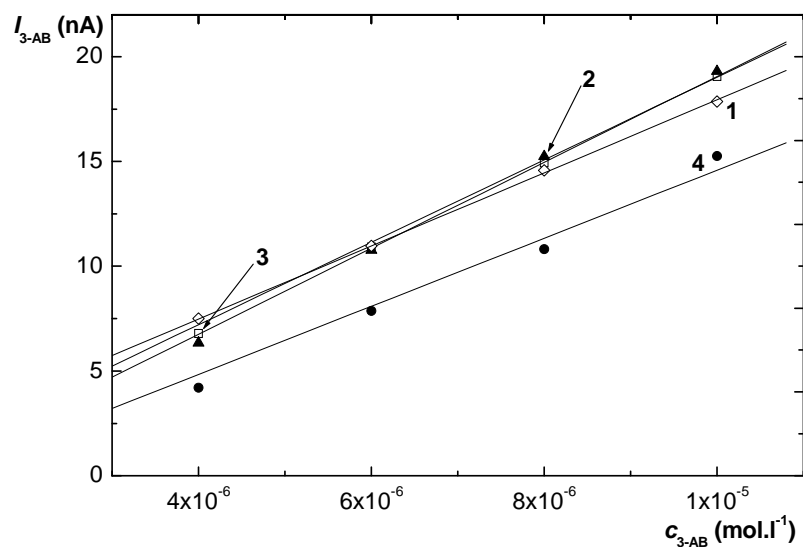
**Obr. 37** Kalibrační závislosti 4-AB v koncentračním rozmezí  $(4 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ , vyhodnoceno z výšky píku 4-AB  $I_{4-AB}$  při měnící se koncentraci 4-AB  $c_{4-AB}$  a při konstantní koncentraci 2-AB  $c_{2-AB}$ . Měřeno metodou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 12,0.  $c_{2-AB}$ :  $4 \cdot 10^{-6}$  (1),  $6 \cdot 10^{-6}$  (2),  $8 \cdot 10^{-6}$  (3),  $10 \cdot 10^{-6}$  (4)  $\text{mol.l}^{-1}$ .



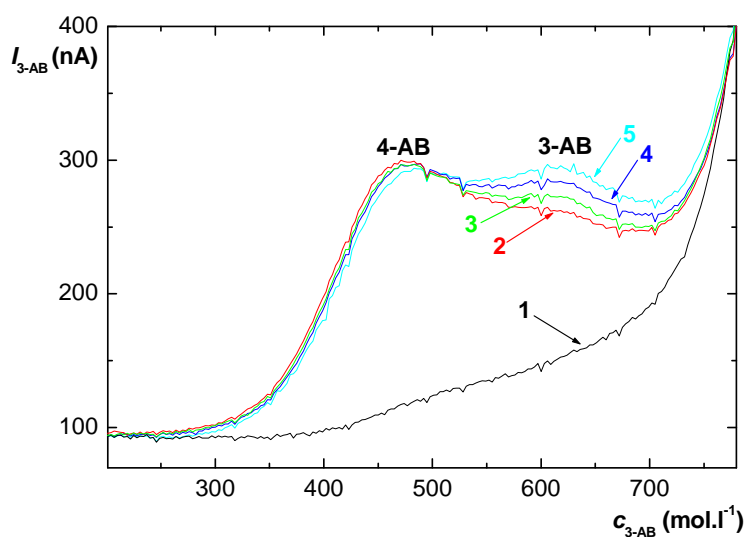
**Obr. 38** Voltamogramy směsi 2-AB a 4-AB v koncentračním rozmezí  $(4 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  při měnící se koncentraci 4-AB  $c_{4\text{-AB}}$  a při konstantní koncentraci 2-AB  $c_{2\text{-AB}} = 10 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ . Měřeno metodou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH12,0. Základní elektrolyt (1),  $c_{4\text{-AB}}$  :  $4 \cdot 10^{-6}$  (2),  $6 \cdot 10^{-6}$  (3),  $8 \cdot 10^{-6}$  (4),  $10 \cdot 10^{-6}$  (5)  $\text{mol.l}^{-1}$ .

**Tab. 13** Parametry kalibračních závislostí 4-AB v koncentračním rozmezí  $(4 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ , vyhodnoceno z výšky píku 4-AB  $I_{4\text{-AB}}$  při měnící se koncentraci 4-AB  $c_{4\text{-AB}}$  a při konstantní koncentraci 2-AB  $c_{2\text{-AB}}$ . Měřeno metodou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 12,0.

$c_{4\text{-AB}} (\text{mol.l}^{-1})$	$c_{2\text{-AB}} (\text{mol.l}^{-1})$	Směrnice ( $\text{nA.mol}^{-1}.\text{l}$ )	Úsek ( $\text{nA}$ )	Korelační koeficient	$L_D$ ( $\text{mol.l}^{-1}$ )
$(4 - 10) \cdot 10^{-6}$	$10 \cdot 10^{-6}$	$(1,52 \pm 0,05) \cdot 10^7$	$-2,04 \pm 3,06$	0,9986	$1,9 \cdot 10^{-7}$
	$8 \cdot 10^{-6}$	$(1,36 \pm 0,04) \cdot 10^7$	$8,20 \pm 2,48$	0,9989	$2,2 \cdot 10^{-7}$
	$6 \cdot 10^{-6}$	$(1,80 \pm 0,01) \cdot 10^7$	$-24,63 \pm 0,94$	0,9999	$1,7 \cdot 10^{-7}$
	$4 \cdot 10^{-6}$	$(1,20 \pm 0,01) \cdot 10^7$	$12,13 \pm 0,71$	0,9999	$2,5 \cdot 10^{-7}$



**Obr. 39** Kalibrační závislosti 3-AB v koncentračním rozmezí  $(4 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ , vyhodnoceno z výšky píku 3-AB  $I_{2-AB}$  při měnící se koncentraci 3-AB  $c_{3-AB}$  a při konstantní koncentraci 4-AB  $c_{4-AB}$ . Měřeno metodou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 12,0.  $c_{4-AB}$ :  $4 \cdot 10^{-6}$  (1),  $6 \cdot 10^{-6}$  (2),  $8 \cdot 10^{-6}$  (3),  $10 \cdot 10^{-6}$  (4)  $\text{mol.l}^{-1}$ .

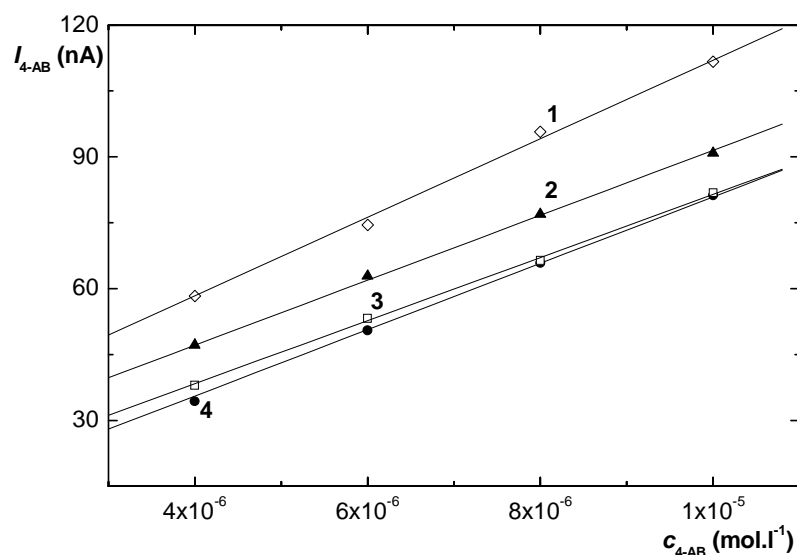


**Obr. 40** Voltamogramy směsi 3-AB a 4-AB získané v koncentračním rozmezí  $(4 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  při měnící se koncentraci 3-AB  $c_{3-AB}$  a při konstantní koncentraci 4-AB  $c_{4-AB} = 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ . Měřeno metodou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 12,0. Základní elektrolyt,  $c_{3-AB}$ :  $4 \cdot 10^{-6}$  (2),  $6 \cdot 10^{-6}$  (3),  $8 \cdot 10^{-6}$  (4),  $10 \cdot 10^{-6}$  (5)  $\text{mol.l}^{-1}$ .

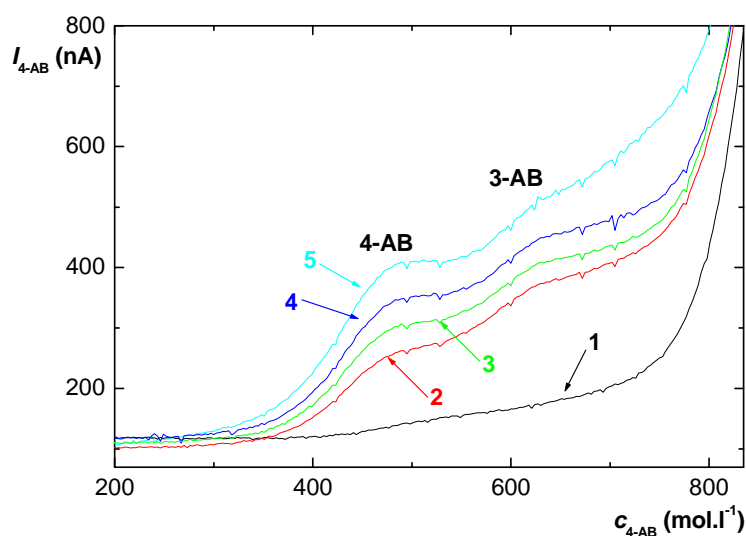


**Tab. 14** Parametry kalibračních závislostí 3-AB získané v koncentračním rozmezí  $(4 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ , vyhodnoceno z výšky píku 3-AB  $I_{3-AB}$  při měnící se koncentraci 3-AB  $c_{3-AB}$  a při konstantní koncentraci 4-AB  $c_{4-AB}$ . Měřeno metodou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 12,0.

$c_{3-AB} \text{ (mol.l}^{-1}\text{)}$	$c_{4-AB} \text{ (mol.l}^{-1}\text{)}$	Směrnice ( $\text{nA.mol}^{-1}.\text{l}$ )	Úsek ( $\text{nA}$ )	Korelační koeficient	$L_D$ ( $\text{mol.l}^{-1}$ )
$(4 - 10) \cdot 10^{-6}$	$10 \cdot 10^{-6}$	$(1,62 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$-1,66 \pm 0,79$	0,9921	$1,9 \cdot 10^{-6}$
	$8 \cdot 10^{-6}$	$(2,05 \pm 0,01) \cdot 10^6$	$-1,45 \pm 0,04$	0,9999	$1,5 \cdot 10^{-6}$
	$6 \cdot 10^{-6}$	$(1,97 \pm 0,12) \cdot 10^6$	$-0,66 \pm 0,77$	0,9948	$1,5 \cdot 10^{-6}$
	$4 \cdot 10^{-6}$	$(1,74 \pm 0,01) \cdot 10^5$	$0,50 \pm 0,10$	0,9999	$1,7 \cdot 10^{-6}$



**Obr. 41** Kalibrační závislosti 4-AB získané v koncentračním rozmezí  $(4 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ , vyhodnoceno z výšky píku 4-AB  $I_{4-AB}$  při měnící se koncentraci 4-AB  $c_{4-AB}$  a při konstantní koncentraci 3-AB  $c_{3-AB}$ . Měřeno metodou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 12,0.  $c_{3-AB}$ :  $4 \cdot 10^{-6}$  (1),  $6 \cdot 10^{-6}$  (2),  $8 \cdot 10^{-6}$  (3),  $10 \cdot 10^{-6}$  (4)  $\text{mol.l}^{-1}$ .



**Obr. 42** Voltamogramy směsi 3-AB a 4-AB získané v koncentračním rozmezí  $(4 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  při měnění se koncentrací 4-AB  $c_{4-AB}$  a při konstantní koncentraci 3-AB  $c_{3-AB} = 10 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ . Měřeno metodou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 12,0. Základní elektrolyt (1),  $c_{4-AB} : 4 \cdot 10^{-6}$  (2),  $6 \cdot 10^{-6}$  (3),  $8 \cdot 10^{-6}$  (4),  $10 \cdot 10^{-6}$  (5)  $\text{mol.l}^{-1}$ .

**Tab. 15** Parametry kalibračních závislostí 4-AB získané v koncentračním rozmezí  $(4 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ , vyhodnoceno z výšky píku 4-AB  $I_{4-AB}$  při měnění se koncentrací 4-AB  $c_{4-AB}$  a při konstantní koncentraci 3-AB  $c_{3-AB}$ . Měřeno metodou DPV s BDDFE v prostředí BR pufru o pH 12,0.

$c_{4-AB} (\text{mol.l}^{-1})$	$c_{3-AB} (\text{mol.l}^{-1})$	Směrnice ( $\text{nA.mol}^{-1}.\text{l}$ )	Úsek ( $\text{nA}$ )	Korelační koeficient	$L_D$ ( $\text{mol.l}^{-1}$ )
$(4 - 10) \cdot 10^{-6}$	$10 \cdot 10^{-6}$	$(7,56 \pm 0,15) \cdot 10^6$	$5,30 \pm 0,98$	0,9994	$3,9 \cdot 10^{-7}$
	$8 \cdot 10^{-6}$	$(7,19 \pm 0,09) \cdot 10^6$	$9,58 \pm 0,60$	0,9998	$4,2 \cdot 10^{-7}$
	$6 \cdot 10^{-6}$	$(7,40 \pm 0,12) \cdot 10^6$	$17,49 \pm 0,81$	0,9996	$4,1 \cdot 10^{-7}$
	$4 \cdot 10^{-6}$	$(8,95 \pm 0,22) \cdot 10^6$	$22,53 \pm 1,48$	0,9991	$3,3 \cdot 10^{-7}$

## Shrnutí

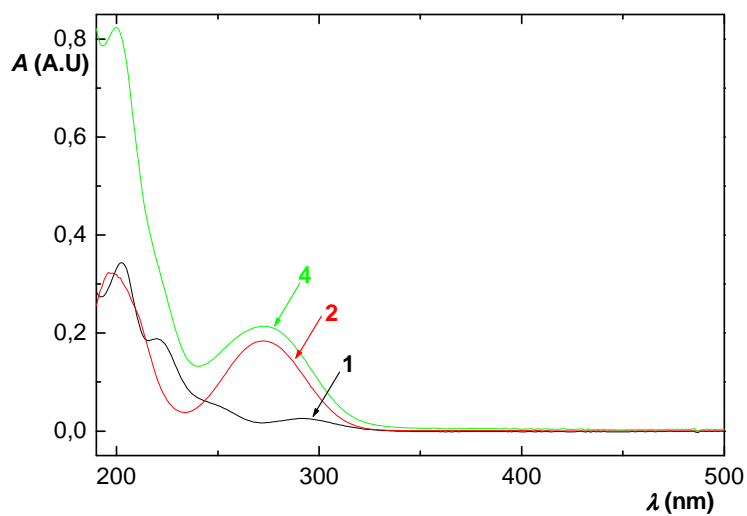
Z dosažených výsledků vyplývá, že 2-AB, 3-AB a 4-AB nelze stanovit ve směsi metodou DPV na BDDFE. Je to způsobeno příliš blízkými hodnotami  $E_p$  2-AB a 3-AB, které neumožňují jejich stanovení ve směsi. Metodou DPV lze tak ve směsi stanovit pouze 2-AB a 4-AB a také 3-AB a 4-AB, jejichž potenciály hlavního oxidačního píku jsou v roztoku BR pufr o pH 12,0 dostatečně vzdáleny a neinterferují s dalšími oxidačními píky. Studované látky

lze stanovit v koncentračním řádu  $10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  a metoda je tak pro dané analyty méně citlivá např. v porovnání s metodou HPLC-ED, která umožňuje stanovení všech tří látek ve směsi v koncentračním řádu  $10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$ .

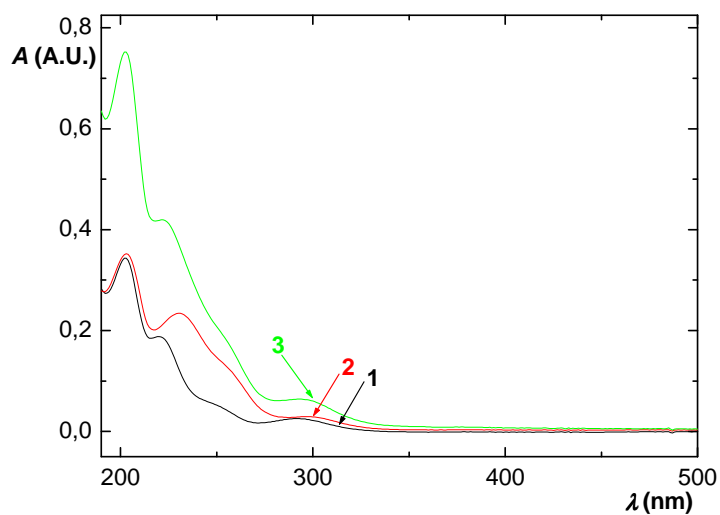
### 3.3 Spektrometrické stanovení 2-aminobifenyly, 3-aminobifenyly a 4-aminobifenyly

Při spektrometrickém stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB byla nejdříve ověřena možnost spektrometrického stanovení studovaných látek vedle sebe. Měření bylo prováděno proti deionizované vodě v křemenné kyvetě o tloušťce  $l$  1 cm. Z Obr. 43 - 45 vyplývá, že vlnové délky  $\lambda$ , při nichž studované látky vykazují svá lokální absorpční maxima, jsou si příliš blízké (2-AB = 292 nm, 3-AB = 297 nm, 4-AB = 273 nm), dané analyty spolu vzájemně interferují v těchto i dalších lokálních maximech, a proto není jejich spektrometrické stanovení ve směsi možné.

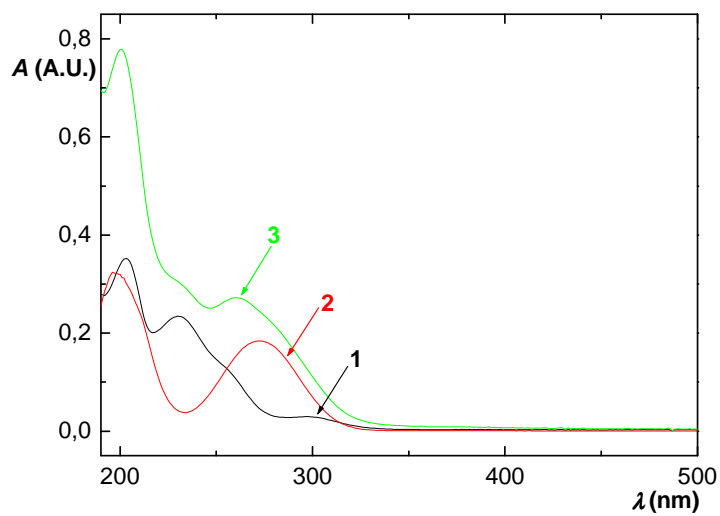
Kalibrační závislosti tak byly proměřeny pro každou látku zvlášť. Při spektrometrickém stanovení byla vyhodnocována absorbance pro vlnovou délku lokálního absorpčního maxima  $A_{\max}$ . Pro 2-AB a 3-AB byly získány kalibrační závislosti v koncentračním rozmezí  $(1 - 100) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  a pro 4-AB v koncentračním rozmezí  $(1 - 1000) \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ . Závislost  $A_{\max}$  2-AB na koncentraci je v logaritmickém měřítku pro celý LDR na Obr. 46, spektrometrické křivky 2-AB zaznamenané v koncentračním rozmezí  $(1 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  jsou na Obr. 47 a parametry kalibračních závislostí tohoto analytu pro jednotlivé koncentrační řády a celý LDR jsou uvedeny v Tab. 16. Na Obr. 48 je logaritmická závislost  $A_{\max}$  3-AB na jeho koncentraci pro celý LDR, spektrometrické křivky 3-AB získané v koncentračním rozmezí  $(1 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  jsou na Obr. 49. Parametry kalibračních přímk 3-AB pro jednotlivé koncentrační řády a celý LDR jsou shrnuty v Tab. 17. Závislost  $A_{\max}$  4-AB na koncentraci je pro celý LDR na Obr. 50, spektrometrické křivky tohoto analytu zaznamenané v koncentračním rozmezí  $(1 - 10) \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$  jsou na Obr. 51 a parametry kalibračních závislostí pro jednotlivé koncentrační řády a celý LDR 4-AB jsou uvedeny v Tab. 18.



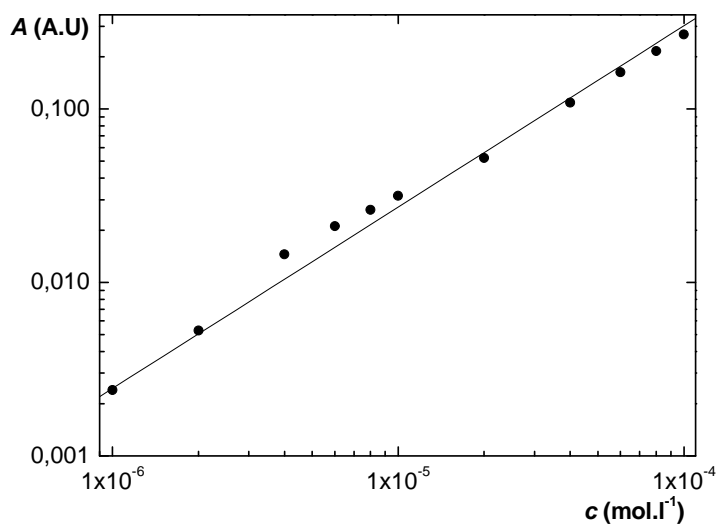
**Obr. 43** UV/VIS spektrum 2-AB (1), 4-AB (2) a směsi obsahující 2-AB s 4-AB (3), každý o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup>. Měřeno metodou molekulové absorpční spektrometrie proti deionizované vodě v křemenné kyvetě tloušťky  $l$  1 cm.



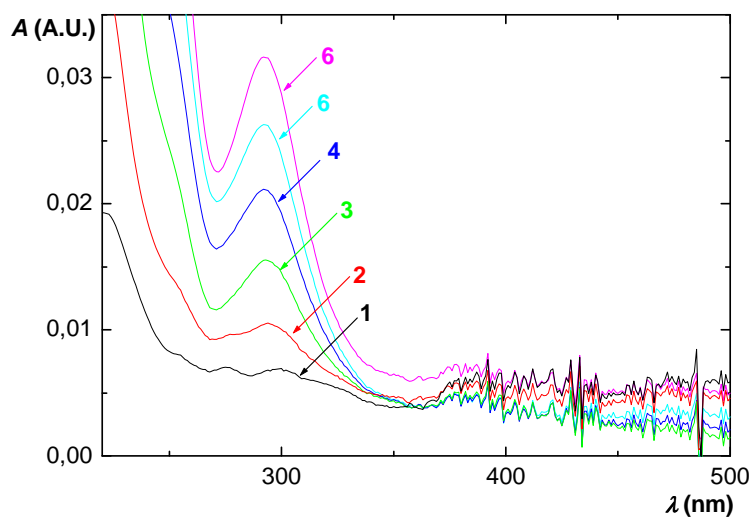
**Obr. 44** UV/VIS spektrum 3-AB (1), 4-AB (2) a směsi obsahující 3-AB s 4-AB (3), každý o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup>. Měřeno metodou molekulové absorpční spektrometrie proti deionizované vodě v křemenné kyvetě tloušťky  $l$  1 cm.



**Obr. 45** UV/VIS spektrum 2-AB (1), 3-AB (2) a směsi obsahující 2-AB s 3-AB (3), každý o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ . Měřeno metodou molekulové absorpční spektrometrie proti deionizované vodě v křemenné kyvetě tloušťky  $l$  1 cm.



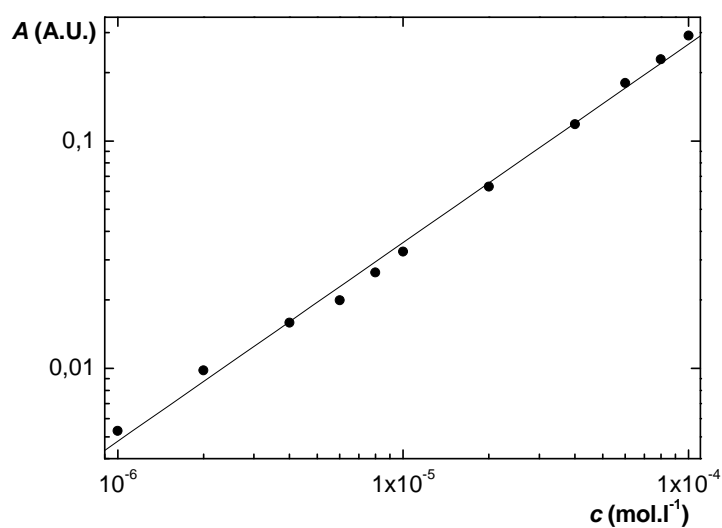
**Obr. 46** Kalibrační závislosti 2-AB v logaritmickém měřítku pro celý lineární dynamický rozsah, vyhodnoceno z výšky absorpčního maxima  $A_{\text{max}}$  při vlnové délce  $\lambda = 292 \text{ nm}$ . Měřeno metodou molekulové absorpční spektrometrie proti deionizované vodě v křemenné kyvetě tloušťky  $l$  1 cm.



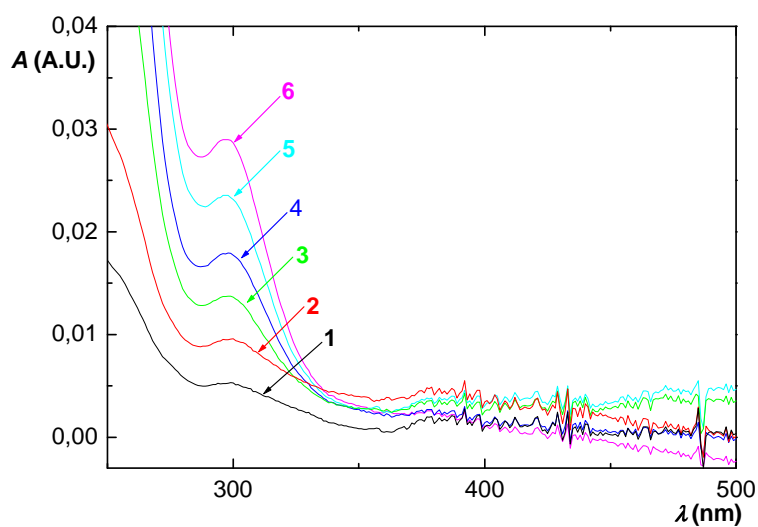
**Obr. 47** UV/VIS spektra 2-AB v koncentračním rozmezí  $(1 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ . Měřeno metodou molekulové absorpční spektrometrie proti deionizované vodě v křemenné kyvetě tloušťky  $l$  1 cm.  $c$  :  $1 \cdot 10^{-6}$  (1),  $2 \cdot 10^{-6}$  (2),  $4 \cdot 10^{-6}$  (3),  $6 \cdot 10^{-6}$  (4),  $8 \cdot 10^{-6}$  (5),  $10 \cdot 10^{-6}$  (6)  $\cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ .

**Tab 16** Parametry kalibračních závislostí 2-AB pro jednotlivé koncentrační řady a celý lineární dynamický rozsah, vyhodnoceno z výšky absorpčního maxima  $A_{\text{max}}$  při vlnové délce  $\lambda = 292 \text{ nm}$ . Měřeno metodou molekulové absorpční spektrometrie proti deionizované vodě v křemenné kyvetě tloušťky  $l$  1 cm.

Koncentrační rozmezí ( $\text{mol.l}^{-1}$ )	Směrnice ( $\text{A.U.mol}^{-1}.\text{l}$ )	Úsek ( $\text{A.U.}$ )	Korelační Koefficient	$L_D$ ( $\text{mol.l}^{-1}$ )
$(1 - 10) \cdot 10^{-5}$	$(2,68 \pm 0,03) \cdot 10^3$	$(0,18 \pm 0,16) \cdot 10^{-2}$	0,9998	-----
$(1 - 10) \cdot 10^{-6}$	$(3,38 \pm 0,20) \cdot 10^3$	$(-0,07 \pm 0,12) \cdot 10^{-2}$	0,9930	$4,4 \cdot 10^{-6}$
$(1-100) \cdot 10^{-6}$	$(2,68 \pm 0,02) \cdot 10^3$	$(0,23 \pm 0,09) \cdot 10^{-2}$	0,9997	$5,6 \cdot 10^{-6}$



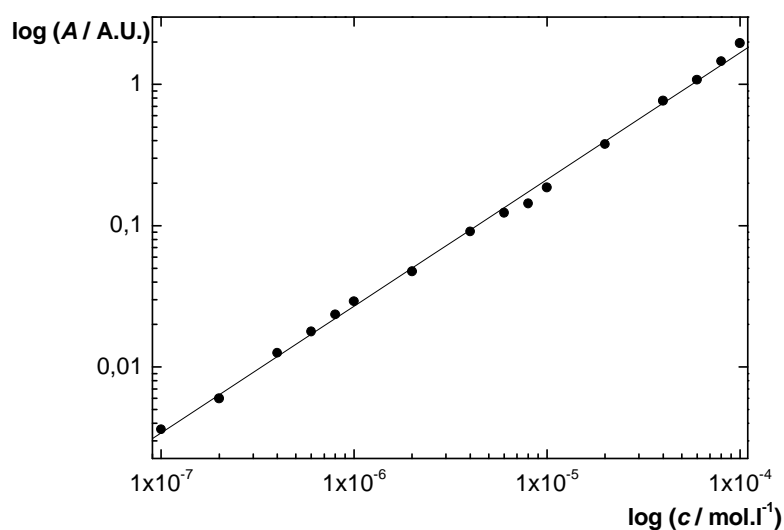
**Obr. 48** Kalibrační závislosti 3-AB v logaritmickém měřítku pro celý lineární dynamický rozsah, vyhodnoceno z výšky absorpčního maxima  $A_{\max}$  při vlnové délce  $\lambda = 297$  nm. Měřeno metodou molekulové absorpční spektrometrie proti deionizované vodě v křemenné kyvetě tloušťky  $l$  1 cm.



**Obr. 49** UV/VIS spektra 3-AB v koncentračním rozmezí  $(1 - 10) \cdot 10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup>. Měřeno metodou molekulové absorpční spektrometrie proti deionizované vodě v křemenné kyvetě tloušťky  $l$  1 cm.  $c$  :  $1 \cdot 10^{-6}$  (1),  $2 \cdot 10^{-6}$  (2),  $4 \cdot 10^{-6}$  (3),  $6 \cdot 10^{-6}$  (4),  $8 \cdot 10^{-6}$  (5),  $10 \cdot 10^{-6}$  (6) . $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup>.

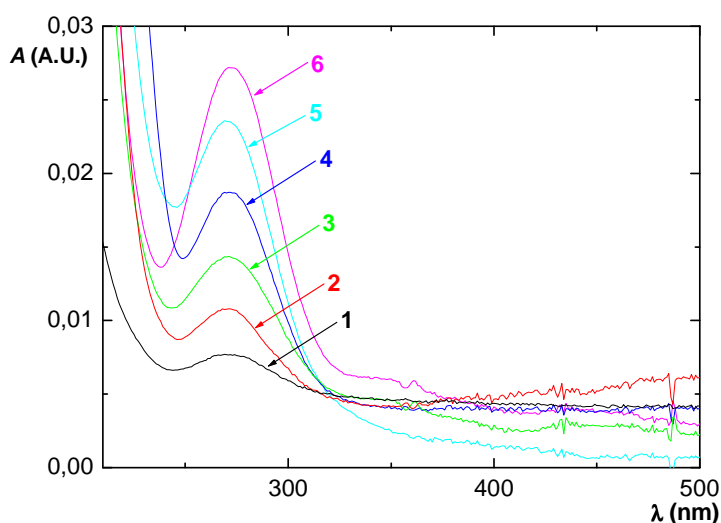
**Tab. 17** Parametry kalibračních závislostí 3-AB pro jednotlivé koncentrační řády a celý lineární dynamický rozsah, vyhodnoceno z výšky absorpčního maxima  $A_{\max}$  při vlnové délce  $\lambda = 297$  nm. Měřeno metodou molekulové absorpční spektrometrie proti deionizované vodě v křemenné kyvetě l tloušťky  $l$  1 cm.

Koncentrační rozmezí (mol.l <sup>-1</sup> )	Směrnice (A.U.mol <sup>-1</sup> .l)	Úsek (A.U.)	korelační koeficient	$L_D$ (mol.l <sup>-1</sup> )
(1 - 10).10 <sup>-5</sup>	(2,84 ± 0,04).10 <sup>3</sup>	(0,55 ± 0,23).10 <sup>-2</sup>	0,9996	-----
(1 - 10).10 <sup>-6</sup>	(2,91 ± 0,11).10 <sup>3</sup>	(0,33 ± 0,07).10 <sup>-2</sup>	0,9972	4,7.10 <sup>-6</sup>
(1 - 100).10 <sup>-6</sup>	(2,86 ± 0,02).10 <sup>3</sup>	(0,40 ± 0,09).10 <sup>-2</sup>	0,9997	4,8.10 <sup>-6</sup>



**Obr. 50** Kalibrační závislosti 4-AB v logaritmickém měřítku pro celý lineární dynamický rozsah, vyhodnoceno z výšky absorpčního maxima  $A_{\max}$  při vlnové délce  $\lambda = 272$  nm. Měřeno metodou molekulové absorpční spektrometrie proti deionizované vodě v křemenné kyvetě tloušťky  $l$  1 cm.





**Obr. 51** UV/VIS spektra 4-AB získané v koncentračním rozmezí  $(1 - 10) \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ . Měřeno metodou molekulové absorpční spektrometrie proti deionizované vodě v křemenné kyvetě tloušťky  $l$  1 cm.  $c$  :  $1 \cdot 10^{-7}$  (1),  $2 \cdot 10^{-7}$  (2),  $4 \cdot 10^{-7}$  (3),  $6 \cdot 10^{-7}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5),  $10 \cdot 10^{-7}$  (6)  $\text{mol.l}^{-1}$ .

**Tab. 18** Parametry kalibračních závislostí 4-AB získané pro jednotlivé koncentrační řady a celý lineární dynamický rozsah, vyhodnoceno z výšky absorpčního maxima  $A_{\text{max}}$  při vlnové délce  $\lambda = 297 \text{ nm}$ . Měřeno metodou molekulové absorpční spektrometrie proti deionizované vodě v křemenné kyvetě tloušťky  $l$  1 cm.

Koncentrační rozmezí ( $\text{mol.l}^{-1}$ )	Směrnice ( $\text{A.U.mol}^{-1}.\text{l}$ )	Úsek ( $\text{A.U.}$ )	Korelační koeficient	$L_D$ ( $\text{mol.l}^{-1}$ )
$(1 - 10) \cdot 10^{-5}$	$(1,91 \pm 0,06) \cdot 10^4$	$(-0,16 \pm 0,3) \cdot 10^{-1}$	0,9977	-----
$(1 - 10) \cdot 10^{-6}$	$(1,70 \pm 0,08) \cdot 10^4$	$(0,16 \pm 0,05) \cdot 10^{-1}$	0,9952	-----
$(1 - 10) \cdot 10^{-7}$	$(2,86 \pm 0,04) \cdot 10^4$	$(0,01 \pm 0,01) \cdot 10^{-1}$	0,9996	$5,2 \cdot 10^{-8}$
$(1 - 1000) \cdot 10^{-7}$	$(1,90 \pm 0,02) \cdot 10^4$	$(0,03 \pm 0,09) \cdot 10^{-1}$	0,9990	$7,9 \cdot 10^{-8}$

## Shrnutí

Z dosažených výsledků vyplývá, že 2-AB, 3-AB a 4-AB nelze vzhledem k překryvu spekter v UV oblasti a blízkým vlnovým délkám lokálních absorpčních maxim stanovit spektrometricky ve směsi. Spektrometricky tak lze stanovit pouze analyzu pouze samostatně s limity detekce pro 2-AB a 3-AB v koncentračním řádu  $10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  a 4-AB v koncentračním

řádu  $10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ . Molekulová absorpční spektrometrie je pro analýzu 2-AB, 3-AB, 4-AB nevýhodná zejména z důvodu, že dané látky se velmi často vyskytují ve vzorku společně a spektrometrická analýza takovéto směsi by nebyla možná. Výhodou spektrometrického stanovení studovaných analytů je zejména jeho relativní přesnost a také časová a instrumentální nenáročnost.

## 4. Závěr

Předkládaná diplomová práce se zabývala vývojem a optimalizací metod pro stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB v modelových směsích.

Při stanovení metodami HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“ a HPLC-UVD byla provedena optimalizace parametrů daných metod. Pro separaci analytů byla použita kolona LiChroCART ChiraDex<sup>®</sup> ( $250 \times 4 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ , Merck, Německo) s kovalentně vázaným  $\beta$ -cyklodextrinem. Jako optimální byly stanoveny tyto parametry: Mobilní fáze připravená smísením octanového pufru o pH 5,0 a koncentraci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ , methanolu a acetonitrilu v poměru 40:30:30 (v/v/v) (převzato z práce <sup>19</sup>), průtoková rychlost mobilní fáze  $F_m$   $1,0 \text{ ml.min}^{-1}$ , dávkovaný objem  $V_{inj}$   $20 \mu\text{l}$ . Při měření metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“ byl na základě hydrodynamických voltamogramů a poměru signál analytů-šum stanoven optimální potenciál detekce  $E_{det} +1,0 \text{ V}$  a dále vzdálenost povrchu elektrody od ústí kapiláry s mobilní fází  $l_k$   $1,5 \text{ mm}$ . Při měření metodou HPLC-UVD byla vlnová délka  $\lambda$   $290 \text{ nm}$  (převzato z práce <sup>18</sup>). Za těchto optimalizovaných podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti a stanoveny meze detekce  $L_D$ . Při stanovení metodou HPLC-UVD byly získány  $L_D$  v koncentračním řádu  $10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$  pro 2-AB a 3-AB a  $10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$  pro 4-AB. Při stanovení metodou HPLC-ED byly získány meze detekce pro všechny tři analyty v koncentračním řádu  $10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$ .

Při analýze směsi 2-AB, 3-AB a 4-AB metodou diferenční pulsní voltametrie bylo zjištěno, že vzhledem k blízkým hodnotám potenciálů píků  $E_p$  2-AB ( $770 \text{ mV}$ ) a  $E_p$  3-AB ( $870 \text{ mV}$ ) v prostředí BR pufru o pH 2,0 nelze tyto dva analyty danou metodou stanovit ve směsi vedle sebe. 2-AB lze stanovit ve směsi s 4-AB v prostředí BR pufru o pH 12,0, neboť hodnoty  $E_p$  2-AB ( $620 \text{ mV}$ ) a  $E_p$  4-AB ( $480 \text{ mV}$ ) vykazují dostatečný rozdíl pro stanovení obou analytů vedle sebe. Také 3-AB a 2-AB lze každý stanovit ve směsi s 4-AB v prostředí BR pufru o pH 12,0 jelikož rozdíl potenciálů hlavních oxidačních píků  $\Delta E_p$   $124 \text{ mV}$  je dostatečně vysoký. Kalibrační závislosti proto byly proměřeny a  $L_D$  stanoveny pro směs

obsahující 2-AB a 4-AB a dále pro směs 3-AB a 4-AB. Při stanovení směsi obsahující 2-AB a 4-AB byly získány  $L_D$  v koncentračním řádu  $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> pro 2-AB a  $10^{-7}$  mol.l<sup>-1</sup> pro 4-AB.  $L_D$  pro směs obsahující 3-AB a 4-AB byly získány v koncentračním řádu  $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> pro 3-AB a  $10^{-7}$  mol.l<sup>-1</sup> pro 4-AB.

Dále bylo zjištěno, že 2-AB, 3-AB a 4-AB nelze stanovit ve směsi spektrometricky, jelikož spektra v UV oblasti se překrývají a vlnové délky lokálních absorpčních maxim  $A_{\max}$  všech tří studovaných analytů jsou si příliš blízká (pro 2-AB, 3-AB a 4-AB  $\lambda = 292$  nm, 297 nm a 273 nm), a proto byly kalibrační závislosti byly proměřeny a  $L_D$  stanoveny pro každou látku zvlášť.

V tab. 19 jsou shrnuty hodnoty  $L_D$  dosažené pro celý lineární dynamický rozsah při analýzách 2-AB, 3-AB a 4-AB v modelových vzorcích s pomocí výše zmíněných metod. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při stanovení metodou HPLC-ED s BDDFE v uspořádání „wall-jet“. Tato metoda poskytuje možnost stanovení všech tří látek ve směsi a zároveň při analýze touto metodou bylo dosaženo i nejnižších hodnot  $L_D$ .

**Tab. 19** Meze detekce  $L_D$  dosažené pro lineární dynamický rozsah při stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB v modelových vzorcích s využitím metod HPLC-ED, HPLC-UVD, DPV a při přímém spektrometrickém stanovení.

Látka	Metoda, stanovení	LDR (mol.l <sup>-1</sup> )	$L_D$ (mol.l <sup>-1</sup> )
2-AB	HPLC-UVD <sup>a</sup>	(1 - 100).10 <sup>-6</sup>	5,1.10 <sup>-7</sup>
2-AB	HPLC-ED <sup>a</sup>	(6 - 10000).10 <sup>-8</sup>	3,8.10 <sup>-8</sup>
2-AB	DPV <sup>b</sup>	(4 - 10). 10 <sup>-6</sup>	v rozmezí (1,8 - 2,5).10 <sup>-6</sup>
2-AB	Spektrofotometrie, $\lambda = 292$ nm <sup>c</sup>	(1 - 100).10 <sup>-6</sup>	5,6.10 <sup>-6</sup>
3-AB	HPLC-UVD <sup>a</sup>	(1 - 1000).10 <sup>-7</sup>	7,3.10 <sup>-7</sup>
3-AB	HPLC-ED <sup>a</sup>	(6 - 10000).10 <sup>-8</sup>	4,4.10 <sup>-8</sup>
3-AB	DPV <sup>d</sup>	(4 - 10). 10 <sup>-6</sup>	v rozmezí (1,5 - 1,9).10 <sup>-6</sup>
3-AB	Spektrofotometrie, $\lambda = 297$ nm <sup>c</sup>	(1 - 100).10 <sup>-6</sup>	4,8.10 <sup>-6</sup>
4-AB	HPLC-UVD <sup>a</sup>	(2 - 10000).10 <sup>-8</sup>	8,7.10 <sup>-8</sup>
4-AB	HPLC-ED <sup>a</sup>	(2 - 10000).10 <sup>-8</sup>	3,6.10 <sup>-8</sup>
4-AB	DPV <sup>e</sup>	(4 - 10). 10 <sup>-6</sup>	v rozmezí (1,7-2,5).10 <sup>-7</sup>
4-AB	DPV <sup>f</sup>	(4 - 10). 10 <sup>-6</sup>	v rozmezí (3,9 - 4,2).10 <sup>-7</sup>
4-AB	Spektrofotometrie, $\lambda = 273$ nm <sup>c</sup>	(1 - 1000).10 <sup>-7</sup>	7,9.10 <sup>-7</sup>

<sup>a</sup> tříložková směs 2-AB, 3-AB a 4-AB

<sup>b</sup> dvousložková směs 2-AB a 4-AB při měnící se  $c_{2-AB}$  a konstantní  $c_{4-AB}$  v rozmezí  
(4 - 10).10<sup>-6</sup> mol.l<sup>-1</sup>

<sup>c</sup> samostatné stanovení

<sup>d</sup> dvousložková směs 3-AB a 4-AB při měnící se  $c_{3-AB}$  a konstantní  $c_{4-AB}$  v rozmezí  
(4 - 10).10<sup>-6</sup> mol.l<sup>-1</sup>

<sup>e</sup> dvousložková směs 2-AB a 4-AB při měnící se  $c_{4-AB}$  a konstantní  $c_{2-AB}$  v rozmezí  
(4 - 10).10<sup>-6</sup> mol.l<sup>-1</sup>

<sup>f</sup> dvousložková směs 3-AB a 4-AB při měnící se  $c_{4-AB}$  a konstantní  $c_{3-AB}$  v rozmezí  
(4 - 10).10<sup>-6</sup> mol.l<sup>-1</sup>

## Literatura

1. Anonymous: Material safety data sheets. Sigma-Aldrich, Praha 2006.
2. Gan, J.; Skipper, P. L.; Gago-Dominguez, M.; Arakawa, K.; Ross, R. K.; Yu, M. C.; Tannenbaum, S. R.: Alkylaniline-hemoglobin adducts and risk of non-smoking-related bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**:19, 1425-1431 (2004).
3. O'Neill, I. K.; Fishbein, L.: An IARC manual series aimed at assisting cancer epidemiology and prevention. "Environmental carcinogens: Selected methods of analysis". *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **26**:3-4, 229-240 (1986). *CA* **105**:185668.
4. Moreira, J. C.; Barek, J.: Analysis of carcinogenic nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons - a review. *Quim. Nova* **18**:4, 362-367 (1995).
5. Chung, K. T.; Adris, P.: Growth inhibition of intestinal bacteria and mutagenicity of 2-, 3-, 4-aminobiphenyls, benzidine, and biphenyl. *Toxicol. in Vitro* **17**:2, 145-152 (2003).
6. Anonymous: International Agency for Research on Cancer (IARC). *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Vol. 1.* WHO, Lyon 1972.
7. Steineck, G.; Plato, N.; Norell, S. E.; Hogstedt, C.: Urothelial cancer and some industry-related chemicals: An evaluation of the epidemiologic literature. *Am. J. Ind. Med.* **17**:3, 371-391 (1990). PubMed ID 2407118.
8. Cerniglia, C. E.; Zhuo, Z.; Manning, B. W.; Federle, T. W.; Heflick, R. H.: Mutagenic activation of the benzidine-based dye direct black by human intestinal microflora. *Mutat. Res.* **175**:1, 11-16 (1986). *CA* **105**:166666.
9. Stiborová, M.: Škodlivé aromatické sloučeniny. *Vesmír* **81**:12, 683-685 (2002).
10. Airoidi, L.; Orsi, F.; Magagnotti, C.; Coda, R.; Randone, D.; Casetta, G.; Peluso, M.; Hautefeuille, A.; Malaveille, C.; Vineis, P.: Determinants of 4-Aminobiphenyl - DNA adducts in bladder cancer biopsies. *Carcinogenesis* **23**:5, 861-866 (2002).
11. Stiborová, M.: Aromatické nitrosloučeniny: Kontaminanty životního prostředí a potenciální karcinogeny pro člověka. *Chem. Listy* **96**:10, 784-791 (2002).
12. Feng, Z.; Hu, W.; Rom, W. N.; Beland, F. A.; Tang, M.: 4-Aminobiphenyl is a major etiological agent of human bladder cancer: evidence from its DNA binding spectrum in human *p53* gene. *Carcinogenesis* **23**:10, 1721-1727 (2002).

13. Iwaki, M.; Sato, S.; Takahashi, K.; Sakairi, H.: Electrical-conductivity of nitrogen and argon implanted diamond. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res.* **209**:5, 1129-1133 (1983).
14. May, P. W.: Diamond thin films: a 21st-century material. *Phil. Trans. R. Soc. A* **358**:1766, 473-495 (2000).
15. Fischer, A. E.; Show, Y.; Swain, G. M.: Electrochemical performance of diamond thin-film electrodes from different commercial sources. *Anal. Chem.* **76**:9, 2553-2560 (2004).
16. Štulík, K.; Pacáková, V.: *Elektroanalytická měření v proudících kapalinách*. SNTL, Praha 1989.
17. Pecková, K.; Mocko, V.; Opekar, F.; Swain, G. M.; Zima, J.; Barek, J.: Miniaturizované ampérometrické detektory pro HPLC a kapilární zónovou elektroforézu. *Chem. Listy* **100**:2, 124-132 (2006).
18. Cvačka, J.: Disertační práce. PřF UK, Praha 2001.
19. Jandová, K.: Diplomová práce. PřF UK, Praha 2007.
20. Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Karolinum, Praha 2002.
21. Barek, J.; Cvačka, J.; Muck, A.; Quaiserová, V.; Zima, J.: Polarographic and voltammetric determination of carcinogenic nitro and amino derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Electroanalysis* **13**:8-9, 799-803 (2001).
22. Ferancová, A.; Korgová, E.; Labuda, J.; Zima, J.; Barek, J.: Cyclodextrin modified carbon paste based electrodes as sensors for the determination of carcinogenic polycyclic aromatic amines. *Electroanalysis* **14**:23, 1668-1673 (2002).
23. Cvačka, J.; Swain, G. M.; Barek, J.; Zima, J.: Stanovení aminonaftalenů a aminobifenylů kapalinovou chromatografií s ampérometrickou detekcí na diamantové elektrodě. *Chem. Listy* **96**:1, 33-38 (2002).
24. Zima, J.; Vaingatová, S.; Barek, J.; Břicháč, J.: HPLC monitoring of biphenyl derivatives with UV and electrochemical detection modes. *Chem. Anal. (Warsaw, Pol.)* **48**:5, 805-816 (2003).
25. Maixnerová, L.: Bakalářská práce. PřF UK, Praha 2008.
26. Pecková K., Jandová K., Maixnerová L., Swain G. M., Barek J.: Amperometric determination of aminobiphenyls using HPLC-ED with boron-doped diamond electrode. *Electroanalysis* **21**:3-5, 316-324 (2009).

27. Maixnerová L.; Pecková K.; Barek, J.: Stanovení aminobifenylů v pitné a v říční vodě HPLC s elektrochemickou detekcí pomocí borem dopované diamantové filmové elektrody. *Chem. Listy* **104**:3, 191-196 (2010).
28. Winkeler, H. D.: Determination of carcinogenic aromatic amines by HPLC/DAD-analysis. *GIT Spezial Chromatographie* **16**:1, 6-11 (1996). *CA* **125**:60807.
29. Čížek K., Barek J., Fischer J., Pecková K., Zima J.: Electroanalysis **19**:12, 1295-1299 (2007).
30. Barek J., Jandová K., Pecková K., Zima J.: Voltammetric determination of aminobiphenyls at a boron-doped nanocrystalline diamond film electrode. *Talanta* **74**:3, 421-426 (2007).